

Modellierung der MYCN-getriebenen Tumorgenese *in vitro* und in transgenen Mausmodellen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
der Fakultät für
Biologie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von

Kathrin Fielitz
aus Dormagen

Februar 2015

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden im onkologischen Labor der Kinderklinik III am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. A. Schramm

2. Gutachter: Prof. Dr. E. Cario

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. S. Knauer

Tag der mündlichen Prüfung: 22.04.2015

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Embryonale und frühkindliche Tumorerkrankungen	1
1.1.1 Das Neuroblastom	1
1.1.2 Das Medulloblastom	4
1.2 Das Glukagonom	5
1.3 Die Rolle des Onkogens NMYC in frühkindlichen Tumorerkrankungen	6
1.3.1 Die Maus als Modellorganismus	8
1.3.1.1 Das Cre-LoxP Modell	8
1.3.1.2 Die Lsl-NMYC Maus	8
1.3.1.3 Cre-Rekombinase transgene Mäuse	10
1.4 Die Histondemethylase JARID1C und ihre Rolle in Krebserkrankungen	14
2. Ziele der Arbeit	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Material	17
3.1.1 Verwendete Antikörper, siRNA und Inhibitoren	17
3.1.2 Verwendete Primer und PCR Bedingungen	18
3.1.3 Verwendete Mauslinien	19
3.1.4 Lösungen und Puffer	19
3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
3.1.6 Kommerzielle Anwendungen, Isolierungs- und Aufreinigungssysteme	26
3.1.7 Kommerzielle Lösungen, Substanzen und Chemikalien	26
3.1.8 EDV	28
3.2 Methoden	29
3.2.1 Methoden der Zellkultur	29
3.2.1.1 Kultivierung etablierter Tumorzelllinien	29
3.2.1.2 Kultivierung primärer Tumorzellen	29
3.2.1.3 Transfektion von Nukleinsäuren durch Lipofektion	30

3.2.1.4 Messung der Zellviabilität mit Hilfe von Tetrazoliumsalz (MTT)	30
3.2.1.5 Bestimmung der Zellviabilität durch Durchflusszytometrie mit Propidiumiodid	31
3.2.1.6 Nachweis von Proliferations- und Apoptoseraten durch Elisa Assays	31
3.2.2 Mauslinien und tierexperimentelle Arbeiten	32
3.2.2.1 Tierhaltung	32
3.2.2.2 Genotypisierung transgener Tiere	32
3.2.2.3 Gewinnung von Gewebe für histologische, biochemische und molekularbiologische Analysen	33
3.2.2.4 Generierung von Xenografts von Pankreaskarzinomzellen und Behandlung mit JQ1	33
3.2.2.5 <i>In vivo Imaging</i> von Luciferase-positiven Tumorzellen	34
3.2.2.6 Glukagon- und Insulinbestimmungen aus Mäuseblut	34
3.2.3 Biochemische Methoden	35
3.2.3.1 Isolierung von Proteinen und Proteinbestimmung	35
3.2.3.2 SDS Gelelektrophorese nach Laemmli	36
3.2.3.3 Western Blotting	36
3.2.4 Methoden der Molekularbiologie	36
3.2.4.1 Isolierung von RNA	36
3.2.4.1.1 Isolierung von RNA aus kultivierten Tumorzellen	36
3.2.4.1.2 Isolierung von RNA aus Gewebe	36
3.2.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe	37
3.2.4.3 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)	37
3.2.4.4 Semiquantitative <i>real-time</i> PCR (qPCR)	37
3.2.4.5 Array basierte komparative genomische Hybridisierung (aCGH)	38
3.2.4.6 mRNA Profiling mit Microarrays	38
3.2.5 Histologische Methoden	39
3.2.5.1 Immunhistochemische Färbung von Zelllinien	39

3.2.5.2 Einbettung von murinen Geweben in Paraffin	40
3.2.5.3 Immunhistochemische Färbungen von Gewebe	40
3.2.5.3.1 Gewebefärbung mittels Färbeautomaten	40
3.2.5.3.2 Manuelle Färbung	40
3.2.5.4 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung	41
3.2.6 Bioinformatische und statistische Methoden	41
3.2.6.1 Analyse von humanen Microarrays	41
3.2.6.2 Analyse der Expressionsdaten von lncRNAs	42
3.2.6.3 Graphische Darstellung und Statistik	43
4. Ergebnisse	44
4.1 Die Rolle der Histondemethylase JARID1C im Neuroblastom	44
4.1.1 JARID1C in humanen Primärtumoren und Zelllinien	44
4.1.2 Effekte siRNA vermittelter Inhibition von JARID1C in vitro	47
4.1.3 Expression von Zielgenen unter siRNA vermittelter JARID1C Inhibition	50
4.1.4 Effekte der chemischen JARID1C Inhibition durch Pbit	52
4.2 Modellierung NMYC getriebener Mausmodelle für pädiatrische Tumorerkrankungen	54
4.2.1 Medulloblastomentwicklung in Lsl-SmoM2;GFAP-Cre Mäusen	54
4.2.2 NMYC Expression in Lsl-NMYC;Nestin-Cre Mäusen	56
4.2.3 Initiale Charakterisierung von Lsl-NMYC;Math-1-Cre transgenen Tieren	58
4.3 NMYC getriebene Tumorentstehung im Lsl-NMYC;GFAP-Cre Mausmodell	59
4.3.1 Allelverteilung und Genotypen der Lsl-NMYC;GFAP-Cre Mäuse	59
4.3.2 Tumorinzidenz und –lokalisation	60
4.3.3 Tumorhistologie und Expression neuroendokriner Marker	63
4.3.4 Glukagon- und Insulinbestimmung in Lsl-NMYC;GFAP-Cre Mäusen	67

4.3.5	Lsl-NMYC;GFAP-Cre Tumore weisen keine genomischen Aberrationen auf	68
4.3.6	mRNA Profiling	68
4.3.7	Zelllinien und Xenografts	69
4.3.8	Indirekte NMYC Inhibition durch Behandlung von Xenografts mit JQ1 und MLN 8237	70
4.3.9	Untersuchung der Sensitivität gegenüber JQ1 und MLN 8237 Behandlung <i>in vitro</i> nach serieller Transplantation	72
5.	Diskussion	73
5.1	Die Rolle der Histondemethylase JARID1C im Neuroblastom	73
5.1.1	Expression von JARID1C in Primärtumoren und NMYC <i>single copy</i> und NMYC amplifizierten Zelllinien	73
5.1.2	Effekte des siRNA vermittelten <i>knock-downs</i> von JARID1C in Neuroblastom Zelllinien	74
5.1.3	Effekte der Pbit vermittelten Inhibition von JARID1C in Neuroblastom Zelllinien	76
5.1.4	Relevanz von Histondemethylasen für die Neuroblastombiologie	76
5.2	Modellierung NMYC getriebener Mausmodelle für pädiatrische Tumormodelle	77
5.3	GFAP-Cre getriebene Tumormodelle in der transgenen Maus	80
5.3.1	Abdominale Tumore der Lsl-NMYC;GFAP-Cre Maus lassen sich als murine Glukagonome beschreiben	80
5.3.2	Hirntumore der Lsl-NMYC;GFAP-Cre Mäuse ähneln humanen Hypophysenadenomen	81
5.3.3	Relevanz des Lsl-NMYC;GFAP-Cre Modells	82
6.	Zusammenfassung und Ausblick	84
7.	Abstract	85
8.	Literaturverzeichnis	86
9.	Anhang	103
9.1	Abkürzungsverzeichnis	103
9.2	Abbildungsverzeichnis	107

9.3 Tabellenverzeichnis	109
9.4 Publikationen und Kongressbeiträge	110
9.5 Lebenslauf	112
9.6 Erklärungen	114

1. Einleitung

1.1 Embryonale und frühkindliche Tumorerkrankungen

In Deutschland erkrankt jedes Jahr durchschnittlich eines von 420 Neugeborenen vor dem 15. Lebensjahr an Krebs, wobei 81 % der Kinder die Erkrankungen überleben (Kinderkrebsregister 2012). 33,8 %, und somit den größten Anteil der Krebserkrankungen, machen Leukämien aus. Tumore des Zentralen Nervensystems (ZNS) bilden die zweitgrößte Gruppe mit 24 %, gefolgt von Lymphomen (11,1 %), peripheren Nervenzelltumoren (7 %), Weichteilsarkomen (5,8 %), Nierentumoren (5,5 %), Knochentumoren (4,4 %) und Keimzelltumoren (3 %). Diese Arbeit konzentriert sich vor allem auf das Neuroblastom sowie weitere Tumore mit Beteiligung des MYCN-Onkogens, wie das Medulloblastom.

1.1.1 Das Neuroblastom

1864 beschrieb der deutsche Mediziner Rudolf Virchow ein Kind mit abdominalem Tumor, den er zunächst als „Gliom“ bezeichnete (Virchow, 1864). Der Pathologe Felix Marchand beschrieb 1891 Eigenschaften des Tumors, die Merkmale von Nervenzellen und Zellen der Nebenniere aufweisen (Marchand, 1891). Die Bezeichnung „Neuroblastom“ wurde erstmals 1910 von James Homer Wright verwendet, der beschrieb, dass der Tumor aus embryonalen Vorläuferzellen des peripheren Nervensystems hervorgeht (Wright, 1910).

Das Neuroblastom ist der häufigste, solide, extrakranielle Tumor im Kindesalter (Brodeur, 2003). Die Inzidenz beträgt 10,2 Fälle auf 1.000.000 Kinder unter 15 Jahren (Ries, 1999). Der Großteil der Erkrankungen wird sehr früh entdeckt, das mediane Diagnosealter liegt bei 17 Monaten (Schwab *et al.*, 2003). Die Symptomatik hängt oft von der Lokalisation des Tumors bzw. der Metastasen ab. Während viele Kinder keine Symptome zeigen, und die Tumore zufällig entdeckt werden, klagen andere Patienten über Bauchschmerzen, Verstopfung oder einen aufgetriebenen Bauch. Diese Symptome lassen sich durch die primäre Lokalisation des Tumors an der Nebenniere erklären. Zum Teil finden sich Neuroblastome auch im Brustkorb (Abb. 1.1) oder an Cervicalganglien, wodurch das Horner Syndrom auftreten kann, das sich durch das Zurückfallen des Augapfels, einseitig verengte Pupille und ein hängendes Lid auszeichnet. Metastasen in den Knochen führen oft zu Schmerzen und zu Anämien. Andere Merkmale der Erkrankung können Fieber, Übelkeit, Müdigkeit, sowie durch Hautmetastasen hervorgerufene bläulich-violette Verfärbungen sein.

20 % der Erstdiagnosen sind Zufallsbefunde, die bei Routineuntersuchungen des Kinderarztes, zum Beispiel bei einer Sonographie, festgestellt werden. Weitere Diagnosemöglichkeiten bestehen in bildgebenden Verfahren wie MRT oder Metajodobenzylguanidin (MIBG) Szintigraphie (Abb.1.1). Eine eindeutige Diagnose kann mittels Biopsie erstellt werden. Die meisten Neuroblastome geben Katecholamine ab, deren Metabolite wie Dopamin, Vanillinmandelsäure oder Homovanillinsäure im Urin nachweisbar sind. In den 1980-1990er Jahren wurde vor allem in Japan, Quebec und Deutschland ein Massenscreening durchgeführt, bei dem Kinder innerhalb der ersten 12 Lebensmonate mittels Katecholamindetektion im Urin untersucht wurden (Schilling *et al.*, 2002). Allerdings erhöhte sich durch diese Untersuchungen lediglich die festgestellte Inzidenz ohne einen Effekt auf die spätere Mortalität zu haben (Janoueix-Lerosey *et al.*, 2010).

Die Erkrankungen werden nach dem *International Neuroblastoma Staging System* (INSS) in fünf Stadien aufgeteilt, abhängig von ihrer klinischen Präsentation (Brodeur *et al.*, 1993). Stadium 1 wird klassifiziert als isolierter, einseitiger Tumor, ohne Befall der Lymphknoten, während im Stadium 2 die Lymphknoten ebenfalls befallen sind. Patienten in Stadium 3 entwickeln Tumoren, die die Körpermitte überschreiten, oder einen einseitigen Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall. In Stadium 4 treten zusätzlich Metastasen auf, z.B. in Knochen, Knochenmark und Leber. Das Stadium 4S zeigt die gleichen Merkmale wie Stadium 4, kommt jedoch nur bei Säuglingen vor. Patienten im Stadium 1, 2 und 4S haben die besten Überlebenswahrscheinlichkeiten, während Patienten in Stadium 4 die schlechteste Prognose haben (Abb.1.1). Neben dem Stadium spielt auch das Diagnosealter eine entscheidende Rolle für die Überlebenswahrscheinlichkeit: je jünger der Patient zum Zeitpunkt der Diagnose ist, desto höher sind seine Überlebenschancen (Abb.1.1).

Das Neuroblastom zeichnet sich insbesondere durch seine große Heterogenität aus. Während einige Fälle schnell und aggressiv voranschreiten und zum Tod der Patienten führen, kommt es andererseits zu spontanen Regressionen (Maris *et al.*, 2007). Bisher ist die Ursache der Spontanregression nicht bekannt.

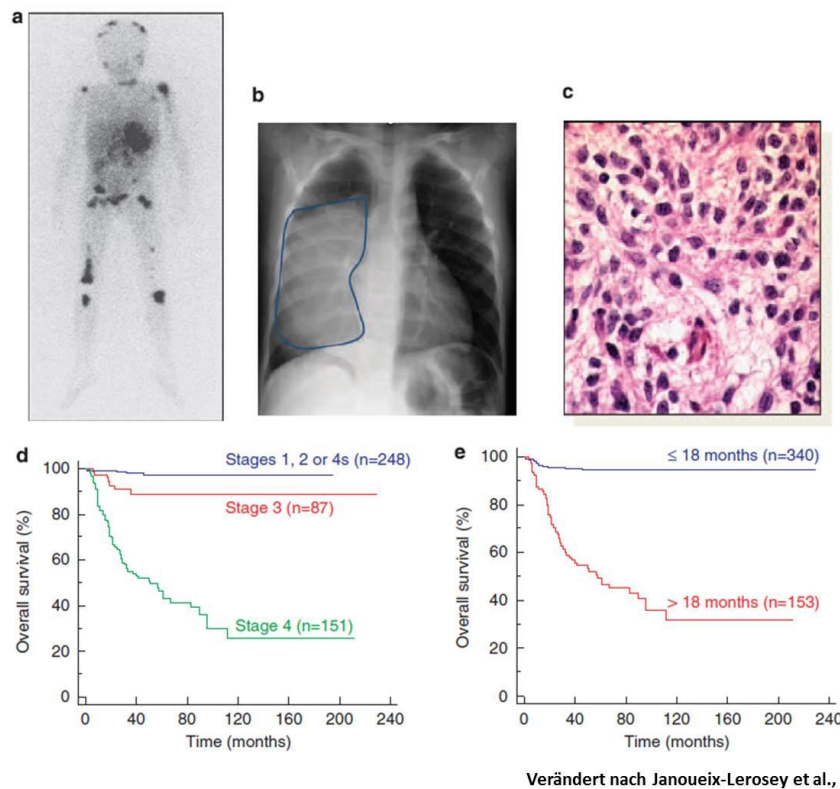


Abbildung 1.1 – Präsentation des Neuroblastoms: Mittels MIBG Szintigraphie lassen sich Tumor und Metastasen im Patienten bildlich darstellen (A). Tumore zeigen sich u.a. in der Nebenniere oder dem Brustraum (A und B). Histologische Untersuchungen können Aufschluss über die Differenzierung der Tumorzellen und den Gehalt an Stromazellen liefern (C). Kaplan-Meier Analysen zeigen die Überlebenswahrscheinlichkeiten in Abhängigkeit von Stadium (D) und Diagnosealter (E).

Betrachtet man die Genetik des Neuroblastoms, lassen sich dadurch jedoch gut Prognosen über den Krankheitsverlauf und Ausgang treffen. Tumore mit Deletionen oder Zugewinnen ganzer Chromosomen, sowie ein triploider Chromosomensatz gehen mit einer guten Prognose einher, wohingegen Patienten mit MYCN Amplifikation, einem Zugewinn des Chromosoms 17q und einer Deletion von 1p eine schlechte Prognose haben (Maris und Matthay, 1999). Ungünstige Prognosemarker sind auch bei normalem MYC-Status die Zugewinne in den Chromosomen 1q, 2p, 12q und 17q, und Deletionen in 3p, 4q und 11q. Generell spielt der Status des Onkogens MYCN eine wichtige Rolle für die Krankheitsprognose. Die Amplifikation von MYCN bedeutet für betroffene Patienten automatisch die Eingruppierung in die Hochrisikogruppe.

1.1.2 Das Medulloblastom

Das Medulloblastom wurde ursprünglich von Bailey und Cushing beschrieben (Bailey und Cushing, 1925). Es handelt sich um einen Tumor des Kindesalters, der dem Cerebellum entspringt und zur Familie der „primitiven neuroektodermalen Tumore“ (PNET) gezählt wird. Histologisch zeichnet sich ein Medulloblastom durch kleine, blaue, runde Zellen aus. Die Prognose der Krebserkrankung ist mäßig bis gut, wobei vor allem das Alter des Kindes, der Grad der Metastasierung, der Resektionsstatus, sowie die Zugehörigkeit zu einer der vier Subtypen Aufschluss über die Prognose liefern. Ursprünglich wurden die Tumore in die Gruppen klassisch, desmoplastisch, großzellig und anaplastisch unterteilt (Gilbertson und Ellison, 2008). Allerdings ließen sich nicht alle Tumore in diese Gruppierung einteilen. Durch Verbesserungen auf dem Gebiet der genetischen und transkriptionellen Analysen wurde 2010 eine neue Einteilung beschlossen (Taylor *et al.*, 2012). Diese neue Einteilung unterscheidet vier Subgruppen von Medulloblastomen – die Wnt Gruppe, die *Sonic hedgehog* (Shh) Gruppe, Gruppe 3 und Gruppe 4.

Die Wnt Gruppe hat mit circa 90 % eine sehr gute Langzeitprognose (Clifford *et al.*, 2006). Sie kommt in allen Altersklassen vor, wobei sie in Kleinkindern eher selten ist und es liegt eine Gleichverteilung zwischen den Geschlechtern vor. Die Tumore zeichnen sich durch klassische Histologie aus. Neben dem Wnt Signalweg, spielt auch die hohe Expression von c-MYC eine große Rolle in diesem Subtyp (Taylor *et al.*, 2012).

Die *Sonic hedgehog* (Shh) Gruppe wurde nach dem gleichnamigen Signalweg benannt, in dem Patienten dieses Subtyps Mutationen zeigen. Patienten mit einer Keimbahn Shh Mutation, entwickeln das Gorlin Syndrom, welches mit einer Prädisposition für Medulloblastome einhergeht (Bale *et al.*, 1998). Auch Menschen mit einer Keimbahnmutation für SUFU, einem Shh Inhibitor, zeigen eine Veranlagung für Medulloblastome (Brugieres *et al.*, 2010). Die Geschlechterverteilung betroffener Patienten liegt bei 1:1, und die höchsten Tumorzinidenzen finden sich im Kleinkind- und Erwachsenenalter. In Kindern und Jugendlichen (3 -16 Jahre) ist der Tumor eher selten. Die Histologie dieses Tumortyps zeigt vor allem ein modulär/ desmoplastisches Erscheinungsbild. Des Weiteren zeichnet sich die Shh Gruppe der Medulloblastome durch eine Deletion des Chromosoms 9q und hohe MYCN Level aus (Taylor *et al.*, 2012).

Der dritte Subtyp der Medulloblastome wird zum Teil auch als MYC Gruppe bezeichnet, da ihre Tumore hohe MYC-Level aufweisen (Hatten und Roussel, 2011). Diese

Medulloblastomgruppe zeigt eine klassische Histologie. Durch ein hohes Vorkommen von Metastasen hat dieser Subtyp eine sehr schlechte Prognose (Northcott *et al.*, 2009). Tumore tauchen in einem Verhältnis von 2:1 vermehrt in männlichen gegenüber weiblichen Patienten auf, und kommen vor allem in Kindern und Kleinkindern vor. Genetisch zeichnet sich diese Gruppe durch eine Zunahme des Chromosoms 1q und/oder eine Deletion der Chromosomen 5q und 10q aus.

In der vierten Gruppe können, analog zum Neuroblastom, Amplifikationen von MYCN vorliegen, allerdings liegen nicht notwendigerweise hohe Expressionslevel von c-MYC oder MYCN vor (Northcott *et al.*, 2009). Dieser Typ kommt in männlichen Patienten öfter vor als in weiblichen, wobei es in 80 % der weiblichen Patienten zu einer Deletion des X Chromosoms kommt. Dieser Subtyp macht über 30 % aller Medulloblastome aus. Die Prognose ist intermediär. Während es für die Medulloblastomgruppen 1-3 transgene Mausmodelle gibt, ist für die Medulloblastome der Gruppe 4 nur ein induzierbares Modell beschrieben (Swartling, 2012) (Swartling *et al.*, 2010).

1.2 Das Glukagonom

Der erste dokumentierte Fall eines Glukagonoms stammt aus dem Jahr 1966 (McGavran *et al.*, 1966). Allerdings gibt es Aufzeichnungen von 1942, die ein Inselzellkarzinom des Pankreas beschreiben, bei dem es sich vermutlich ebenfalls um ein Glukagonom handelte (Becker, 1942). Die Bezeichnung Glukagonom beschreibt einen endokrinen pankreatischen Tumor, der sich vor allem durch starke Glukagonsekretion auszeichnet. Es ist ein sehr seltener Tumor mit einer Inzidenz von 1 in 20 Millionen (Frankton und Bloom, 1996). Bis 1998 wurden weltweit nicht mehr als 407 Fälle dokumentiert (Soga und Yakuwa, 1998). In der statistischen Analyse dieser Fälle wurde ein Verhältnis von 0,8 zwischen den männlichen und weiblichen Patienten verzeichnet (Soga und Yakuwa, 1998). Der Altersdurchschnitt der Patienten liegt bei 52,5 Jahren. Die Tumore wachsen sehr langsam (Boden, 1989) und treten oft in Verbindung mit dem multiplen endokrinen Neoplasie Syndrom Typ 1 (MEN 1) auf (13 %) (Stacpoole *et al.*, 1981). 97 % der Tumore tauchen im Pankreas auf (Boden, 1989), wobei in einzelnen Patienten Tumore außerhalb der Bauchspeicheldrüse vorkommen – in der Niere (Gleeson *et al.*, 1971), dem Duodenum (Roggli *et al.*, 1979), der Lunge (Hunstein *et al.*, 1988) oder der Leber (De Giorgio *et al.*, 1998). Die Tumore haben meist einen Durchmesser von ca. 5 cm (Boden, 1989), wobei es eine Korrelation zwischen Tumorgröße und Prognose

gibt (Soga und Yakuwa, 1998). Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen etwa 90 % der Patienten Metastasen auf (Frankton und Bloom, 1996), wobei die meisten Metastasen in der Leber (80%), den Lymphknoten (37,8 %), den Knochen (8,1 %), der Lunge (2,1 %) oder der Nebenniere (1,4 %) auftreten (Soga und Yakuwa, 1998).

Histologisch zeigen Glukagonome keine besonderen Auffälligkeiten (Warner *et al.*, 1983). Benigne Tumore sind im Gegensatz zu malignen Tumoren stark granuliert (Bloom und Polak, 1987; Mozell *et al.*, 1990).

Bei vielen Patienten tritt neben den Tumoren eine nekrolytische Dermatitis auf (Wilkinson, 1971). Erkrankte leiden des Weiteren oft an Gewichtsverlust, Thrombosen (Boden, 1989) und Diabetes (Soga und Yakuwa, 1998). Glukagonspiegel im Plasma von Tumorpatienten können Werte von 500 pg/ ml bis zu 1000 pg/ml erreichen, wobei der Normbereich bei 130 pg/ ml liegt (Christopoulos, 2001).

1.3 Die Rolle des Onkogens MYCN in frühkindlichen Tumorerkrankungen

Der Transkriptionsfaktor MYCN wurde 1983 im Neuroblastom als amplifiziertes Homolog zu v-MYC identifiziert (Schwab *et al.*, 1983; Kohl *et al.*, 1983). MYCN ist Teil einer bHLH (*basic helix-loop-helix*) Protein-Familie, die nach ihrer dreidimensionalen Faltungsstruktur benannt wurde. Die Mitglieder dieser Familie bilden Homo- und Heterodimere. Diese Dimere erkennen in der DNA die Sequenz CACGTG, die auch E-Box genannt wird. MYCN bildet ein Heterodimer mit dem bHLH Protein Max, bevor es an die E-Box bindet (Facchini und Penn, 1998). MYCN, sowie andere Mitglieder der MYC Proteinfamilie, v-MYC, c-MYC oder L-MYC, spielen bei wichtigen Zellprozessen wie Proliferation, Wachstum, Apoptose und Differenzierung eine Rolle (Eisenman, 2001; Dang, 1999). MYCN ist gleichzeitig in der Lage Proliferation zu fördern und Differenzierung zu unterdrücken, wodurch bei maligner Entartung schnelles Wachstum des Tumors gefördert wird.

Im fetalen Gehirn wird MYCN für die Differenzierung und Zellwanderung von neuronalen Vorläuferzellen benötigt (Knoepfler *et al.*, 2002). Wird MYCN ausgeschaltet, zeigen die Tiere verkleinerte Gehirne, vor allem das Cerebellum ist um ein sechsfaches kleiner als in Kontrollen (Knoepfler *et al.*, 2002).

MYCN wurde ursprünglich im Neuroblastom identifiziert. Innerhalb von zwei Jahren nach seiner Entdeckung wurde die MYCN Amplifikation mit der aggressiven Entwicklung und schlechten Prognose von Neuroblastompatienten assoziiert (Brodeur *et al.*, 1984). Die MYCN

Level korrelieren im Neuroblastom mit dem Grad der Metastasierung (Benard, 1995), sowie mit einer gesteigerten Vaskularisierung der Tumore (Meitar *et al.*, 1996). MYCN kann zudem den Stammzellcharakter von Tumorzellen bewahren (Chappell und Dalton, 2013). Die Tropomyosin Rezeptorkinase A (TrkA), deren Expression im Neuroblastom mit guter Prognose assoziiert wird (Maris und Matthay, 1999), kann von MYCN runterreguliert werden (Iraci *et al.*, 2011). Die Tropomyosin Rezeptorkinase B (Trk B), die im Neuroblastom mit einer Chemotherapieresistenz verbunden wird (Ho *et al.*, 2002), wird oft in MYCN amplifizierten Neuroblastomen exprimiert und ist in der Lage, MYCN mRNA hoch zu regulieren (Dewitt *et al.*, 2014).

Auch im Medulloblastom spielt MYCN eine Rolle. So finden sich in der Shh Subgruppe hohe MYCN Level, während in der dritten Gruppe c-MYC hoch exprimiert ist (Taylor *et al.*, 2012). In der vierten Medulloblastomsubgruppe, liegt in vielen Tumoren eine MYCN Amplifikation vor (Northcott *et al.*, 2009).

MYCN galt lange als therapeutisch schlecht nutzbares Target. Erst in jüngster Zeit wurden, mit Bromodomänen Inhibitoren wie z.B. JQ1 und Aurorakinase Inhibitoren wie z.B. MLN 8237, indirekte Verfahren zur MYCN Inhibition entwickelt.

Proteine mit Bromodomänen erkennen acetylierte Lysine in der N-terminalen Region von Histonen und können Chromatinumbau und die Genexpression beeinflussen (Wu und Chiang, 2007). Ein Beispiel für Proteine mit Bromodomänen ist BRD4, welches unter anderem, an den MYCN Promotor binden kann (Delmore *et al.*, 2011). JQ1 wurde 2010 von Filippakopoulos *et al.* als Inhibitor von BRD4 entwickelt (Filippakopoulos *et al.*, 2010). JQ1 ist ein Inhibitor für Bromodomänen und extraterminale Domänen, der die Bindetasche blockiert, in die BRD4 an die Lysin-Reste von Chromatin binden soll (Puissant *et al.*, 2013). Durch diese Blockade werden die Lysine nicht mehr acetyliert, wodurch die Transkription an dieser Stelle gehemmt wird (Delmore *et al.*, 2011). Es konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von BRD4 durch JQ1 auch Einfluss auf MYCN hat (Puissant *et al.*, 2013). Eine Behandlung mit JQ1 im Mausmodell führte zu signifikanter Verringerung des Wachstums, sowohl von experimentellen Medulloblastomen (Henssen *et al.*, 2013), als auch von Neuroblastomzellen *in vivo* und *in vitro*. Ebenso fand sich nach JQ1 Behandlung höhere Apoptose- und geringere Proliferationsraten (Althoff *et al.*, 2014).

MYCN wird durch Ubiquitinligasen, wie Fbxw7 degradiert (Sjostrom *et al.*, 2005). In MYCN amplifizierten Neuroblastomzelllinien können zum Teil hohe Level der Aurorakinase A

beobachtet werden (Otto *et al.*, 2009). Die Aurorakinase A bindet an MYCN und verhindert so seine Fbxw7 bedingte Degradation (Otto *et al.*, 2009). Die Inhibition der Aurorakinase A durch den Inhibitor MLN 8237 resultiert in einem Abbau des MYCN Proteins (Brockmann *et al.*, 2013). Eine Behandlung mit MLN 8237 von Neuroblastomzellen *in vitro* verringert die Zellviabilität und die MYCN Protein Level (Althoff *et al.*, 2014).

1.3.1 Die Maus als Modellorganismus

1.3.1.1 Das Cre-LoxP Modell

Das Cre-LoxP Modell beruht auf den Grundzügen der Rekombination, bei der durch bestimmte Enzyme, die Rekombinasen genannt werden, Spaltungen und Neuverknüpfungen der DNA herbeigeführt werden. Die Cre (*causes recombination* oder *cyclization recombination*) Rekombinase ist eine sequenzspezifische Rekombinase, die aus dem Phagen P1 stammt (Sauer, 1998). Die Cre-Rekombinase katalysiert die sequenzspezifische Rekombination zwischen definierten, 34 bp langen, LoxP Sites (*locus P of crossover P1*). Ein Gen, das sich zwischen den LoxP Sites befindet und der Cre Aktivität ausgesetzt wird, wird ausgeschnitten („*floxed-out*“). Wenn die Cre Aktivität unter der Kontrolle eines definierten Promotors steht, lassen sich auf diese Weise gezielt *knock-out* Modelle und *knock-in* Modelle erzeugen. Durch Nutzung einer GFAP-Cre Maus konnte so beispielsweise ein gezielter *knock-out* verschiedener Gene in Astrozyten der Maus erreicht werden (Casper *et al.*, 2007). Ein Beispiel für ein *knock-in* Modell ist die Lsl-MYCN;Dbh-iCre Maus, bei der durch das Cre vermittelte Herausschneiden einer Polyadenyl-Stoppsequenzen in Zellen unter Kontrolle des Dopamin β -Hydroxylase (Dbh) Promotors das Onkogen MYCN exprimiert werden kann (vergl. Kap. 1.3.1.2; (Althoff *et al.*, 2014)).

1.3.1.2 Die Lsl-MYCN Maus

Zur Überexpression von MYCN in transgenen Modellsystemen steht die Lsl-MYCN Maus zur Verfügung, die 2014 von Kristina Althoff beschrieben wurde (Althoff *et al.*, 2014). Bei der Generierung dieser Maus wurden humane MYCN cDNA unter der Kontrolle des Hühner Aktin Promotors (CAG), eine von zwei loxP Sites flankierte Polyadenyl-Stoppsequenzen (Lsl), sowie eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und ein Luciferase Gen (Fluc) in einen Vektor mit Rekombinase-vermittelter Kassettenaustauschstelle (RMCE) eingebracht

(Abb. 1.2). Dieses Konstrukt wurde in den ROSA26 Genlocus von C57Bl/6N embryonalen Stammzellen kloniert und transgene Mäuse hieraus generiert (Althoff *et al.*, 2014).

Eine Verpaarung der Lsl-MYCN Maus mit der Dbh-iCre Maus führte zu einer MYCN-Aktivierung in der Neuralleiste und nachfolgend bei 76 % der doppelt-transgenen Nachkommen zu abdominalen Tumoren, die als Neuroblastome identifiziert werden konnten (Althoff *et al.*, 2014).

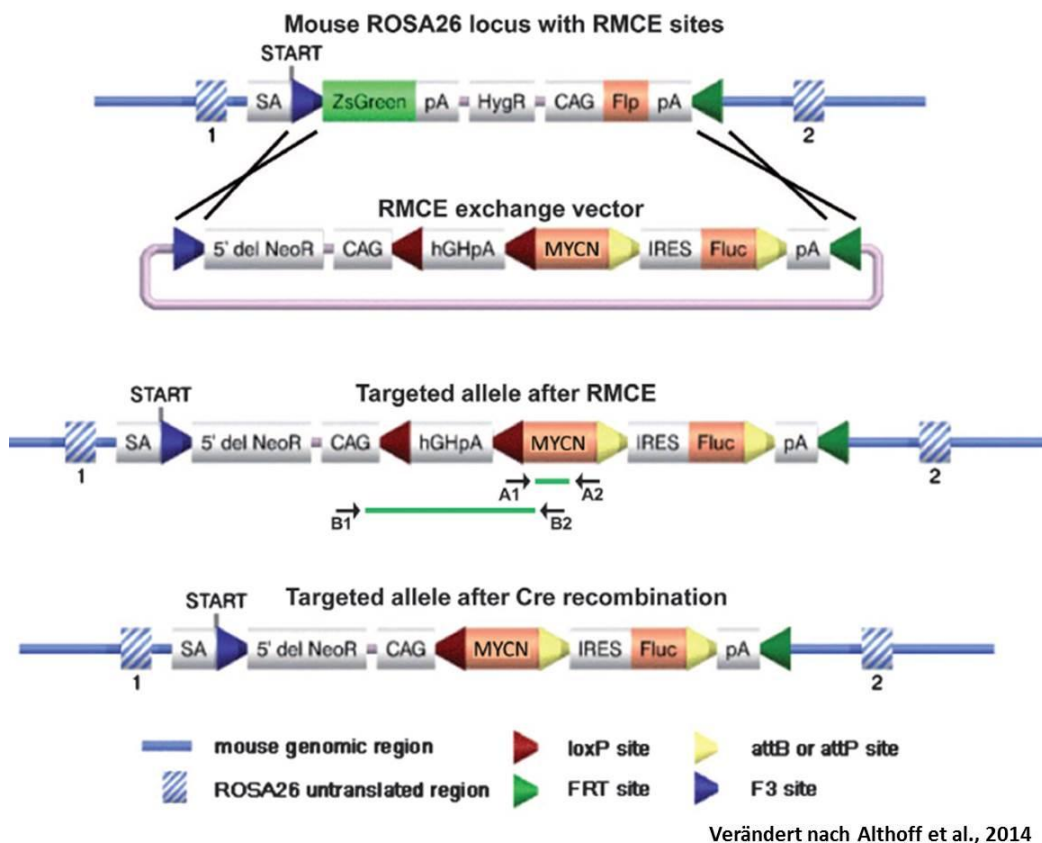


Abbildung 1.2 – Schematische Darstellung des Lsl-MYCN Konstrukts im ROSA26 Locus: In den ROSA 26 Genlocus von F1 RMCE 103 embryonalen Stammzellen der Maus wurden RMCE (Rekombinase-vermittelter Kassettenaustausch) genutzt um einen CAG-Lsl-MYCN-IRES-Fluc-RMCE Austauschvektor einzubringen. Durch Aktivität eines Cre Enzyms werden die Stoppssequenzen ausgeschnitten. CAG – Hühner Aktin Promotor, hGHpA – Polyadenyl-Stoppsequenz, A1/A2 – Primer zur Amplifikation des MYCN-Transgens, B1/B2 – Primer zur Validierung des Ausschneidens der Polyadenyl-Stoppsequenz.

1.3.1.3 Cre-Rekombinase transgene Mäuse

Um Zielgene in cerebellären Vorläuferzellen zu exprimieren, stehen eine Reihe von Cre-Tieren zur Verfügung, u.a. GFAP-Cre, Math-1-Cre und Nestin-Cre. Die drei Proteine dienen als Marker für Vorläuferzellen in der frühen Embryogenese und Kleinhirnentwicklung.

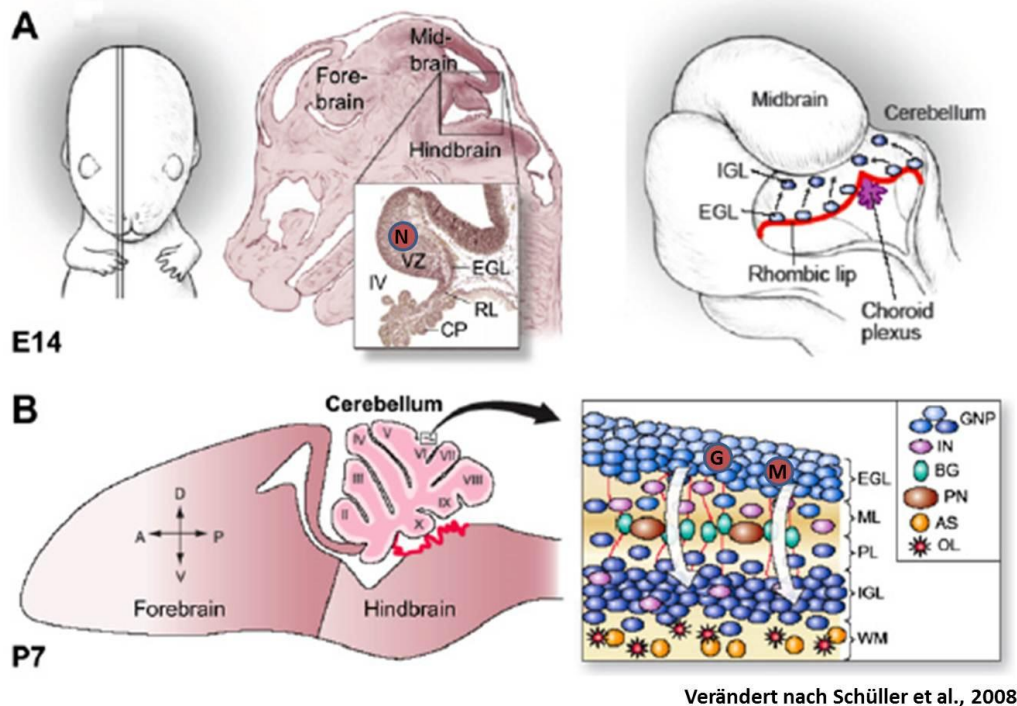


Abbildung 1.3 – Entwicklung des Cerebellums in der Maus: Das Cerebellum entwickelt sich ab E 14 aus der rostralen Rhombischen Lippe (RL) und der Ventrikularzone (VZ) des Metencephalons. In der Ventrikularzone wird Nestin exprimiert (N) (A). Bei P7 sind die 10 Lobi des Cerebellums, sowie die Zellschichtung weitgehend ausgebildet, GFAP (G) wird in Granulozytenvorläuferzellen exprimiert, Math-1 (M) in Zellen des EGL (B). GNP, Granulozytenvorläuferzellen, IN, Interneuron, BG, Bergmann Glia, PN, Purkinjoneuron, AS, Astrozyte, OL, Oligodendrozyte, EGL, Externe granuläre Schicht, ML, Molekularzellschicht, PL, Purkinjenzellschicht, IGL, interne granuläre Schicht, WM, Weiße Substanz.

Das Cerebellum entwickelt sich aus dem rostralen Teil der Rhombischen Lippe und der Ventrikularzone des Metencephalon, dem Hinterhirn. Aus der Ventrikularzone entspringen Interneurone, Gliazellen und Purkinje Neurone. Ab Embryonaltag 13 bildet die rostrale Rhombische Lippe Granulozytenvorläuferzellen, die rostral migrieren und die externe granuläre Schicht (EGL) bilden. Am postnatalen Tag sieben ist das Cerebellum gyrifiziert und die Gewebsschichten, bestehend aus Molekularschicht, Purkinjenzellschicht, sowie EGL und

weißer Substanz sind ausgebildet. Im EGL kommt es zu massiven Proliferationen. Die Purkinjezellen produzieren das Molekül *Sonic Hedgehog*, das an den *Patched*-Rezeptor der Granulozytenvorläuferzellen im EGL bindet, wodurch die Proliferation der Zellen gestoppt wird. Die Vorläuferzellen migrieren nach innen, passieren die Purkinjezellen und bilden die interne granuläre Zellschicht (IGL), in der sie zu glutamatergen (erregenden) Neuronen differenzieren. Der Prozess ist in der Maus am fünfzehnten postnatalen Tag abgeschlossen (vergl. Abb.1.3).

In der Maus und im Menschen finden sich Homologe zum *atonal* Gen in *Drosophila* (Jarman *et al.*, 1993): das *mouse atonal homolog 1* (Math-1) bzw. das *human atonal homolog 1* (Hath-1). In der Maus wird Math-1 während der frühen Embryogenese in Neuroblasten des Metencephalons und Myelencephalons exprimiert (Ben-Arie *et al.*, 1996). Eine hohe Expression zeigt sich auch in der Rhombischen Lippe, aus der sich das Cerebellum entwickelt. Postnatal zeigt sich eine hohe Math-1 Expression im EGL des Cerebellums, die bis P7-10 nachweisbar ist (Ben-Arie *et al.*, 1997; Schuller *et al.*, 2008).

In einer Math-1 defizienten Maus wird das EGL des Cerebellums nicht ausgebildet (Dubuc *et al.*, 2010). Ben-Arie kreierte 1997 eine Math-1 *knock-out* Maus und konnte in histologischen Untersuchungen deutlich zeigen, dass diese Tiere im Vergleich zu

Kontrollen keine Gyrifizierung des Cerebellums zeigen und das EGL nicht vorhanden ist (Abb. 1.4). Des Weiteren ist die Purkinjezellschicht, die normalerweise vom EGL bedeckt wird, weniger organisiert als bei Kontrolltieren (Abb. 1.4). Ben-Arie zeigt damit deutlich, dass Math-1 für die cerebelläre Entwicklung enorm wichtig ist. Im Shh Subtyp des Medulloblastoms ist Math-1 hochreguliert, bleibt in den anderen drei Medulloblastomgruppen jedoch unverändert (Salsano *et al.*, 2004). Eine Deletion von Math-1 führte zudem zur

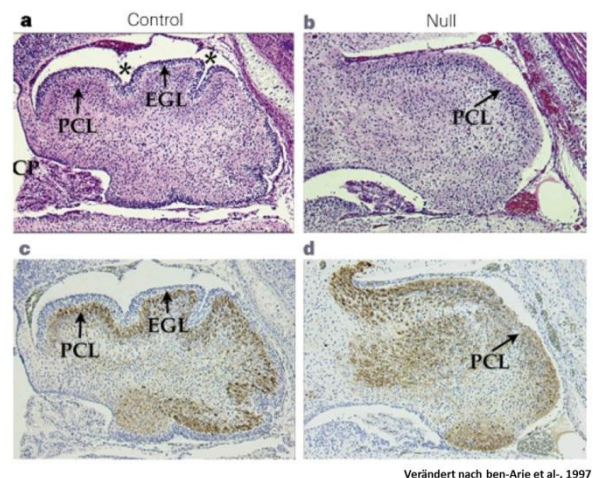


Abbildung 1.4 – In Math-1 *knock-out* Mäusen kommt es zu Abnormalitäten in der cerebellären Entwicklung: Math-1 *knock-out* Mäuse zeigen keine Faltung des Cerebellums, kein EGL und eine unorganisierte Purkinjezellschicht (PCL). (a) und (b) zeigen HE Färbungen, (c) und (d) Färbungen gegen Calbindin.

Inhibition des Tumorwachstums in einem *smoothed* getriebenen Medulloblastom-Mausmodell (Flora *et al.*, 2009).

Die von uns verwendete Math-1 Cre Maus wurde 2005 beschrieben (Matei *et al.*, 2005) und bereits von Ulrich Schüller genutzt um durch SmoM2 Überexpression Medulloblastome im Mausmodell zu erzeugen (Schuller *et al.*, 2008). Die dort exprimierte SmoM2 Mutation wurde ursprünglich von Xie *et al.* im Basallzellkarzinom erwähnt (Xie *et al.*, 1998). Die SmoM2 Maus wurde von Ulrich Schüller auch in einer Verpaarung mit einer GFAP-Cre Maus verwendet. Ähnlich wie die SmoM2;Math-1 Mäuse entwickelten die SmoM2;GFAP-Cre Mäuse diffuse Tumore mit der für Medulloblastome charakteristischen Histologie aus kleinen, runden, blauen Zellen (Abb.1.5) (Schuller *et al.*, 2008).

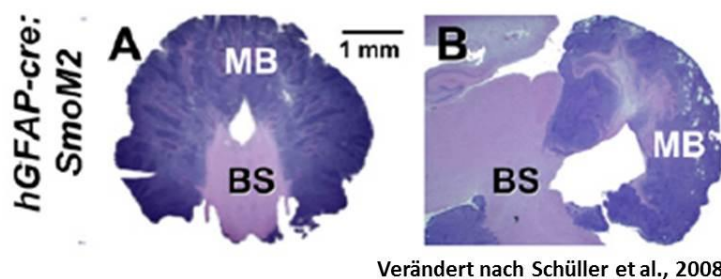


Abbildung 1.5 – Medulloblastom-entwicklung in der SmoM2;GFAP-Cre Maus: Die Tiere entwickeln diffuse Tumore mit typischer Medulloblastom Histologie aus kleinen, blauen, runden Zellen.

GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) ist ein TYP III Intermediärfilamentprotein, das ursprünglich als Marker für Astrozyten beschrieben wurde (Eng *et al.*, 2000). Es wurde später ebenfalls in Gliazellen in zentralen und peripheren Nervensystem identifiziert (Yen und Fields, 1981). Ulrich Schüller konnte durch seine Arbeiten beweisen, dass GFAP auch in Granulozytenvorläuferzellen des Cerebellums exprimiert wird (Schuller *et al.*, 2008). Neben neuronalen Strukturen wird GFAP auch in Schwann Zellen des Darms (Jessen und Mirsky, 1980), Leydigzellen der Hoden (Miettinen *et al.*, 1985), hepatischen Stellarzellen der Leber (Gard *et al.*, 1985), Podozyten und Mesangiozyten der Nieren (Buniatian *et al.*, 1996), Stellarzellen des Pankreas (Apte *et al.*, 1998) und der Haut exprimiert (Danielyan *et al.*, 2007). Neben den Stellarzellen des Pankreas wird GFAP außerdem in glukagonproduzierenden Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreasgewebes exprimiert (Regoli *et al.*, 2000). Bertelli konnte zeigen, dass GFAP auch in α -Zellen des Pankreas exprimiert wird (Bertelli *et al.*, 2000).

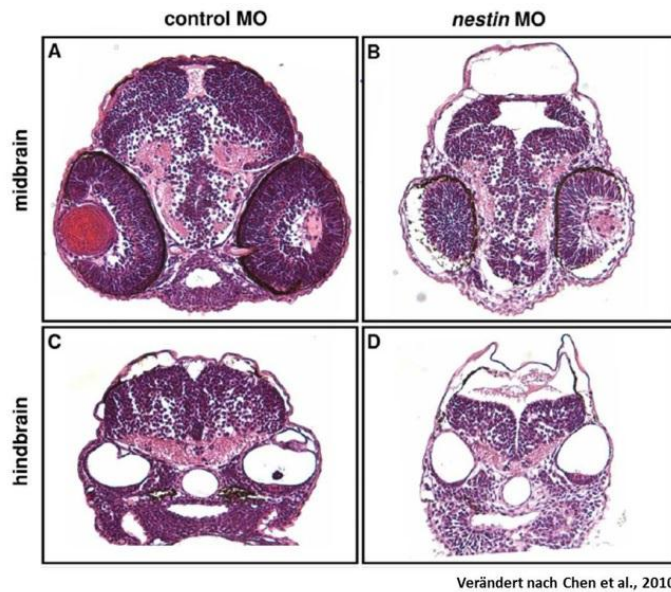


Abbildung 1.6 – Nestin knock-out im Zebrafisch: Nestin defiziente Zebrafische zeigen Defekte in der Gehirn- und Augenentwicklung.

Nestin ist ein Typ VI Neurofilament Protein, das vor allem in neuroepithelialen Stammzellen exprimiert wird (Lendahl *et al.*, 1990). Nestin formt zusammen mit Vimentin und Desmin Heterodimere, die im Verbund mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten das Cytoskelett bilden (Sjoberg *et al.*, 1994). In sich entwickelnden Mäuseembryos kann Nestin zu Beginn der Neurulation erstmals detektiert werden und ist in adulten Neuronen runterreguliert (Lendahl *et al.*, 1990).

Im proliferativen CNS ist eine Nestin Expression bereits ab Embryonaltag 7,75 nachweisbar (Dahlstrand *et al.*, 1995). An Embryonaltag 10,5 findet sich die Nestinexpression im rostralen und caudalen Neuralrohr und ist zwischen Embryonaltag 15,5 und der Geburt in der Subventrikular- und Ventrikularzone des entwickelnden Cerebellums detektierbar (Dahlstrand *et al.*, 1995). Nestin ist ein hoch konserviertes Gen, und seine Expression ist auch im Zebrafisch nachweisbar (Chen *et al.*, 2010). Die genaue Funktion von Nestin ist bisher unbekannt. Genetische Deletion der Nestinexpression im Zebrafisch führt zu einer Reduktion der neuralen Vorläuferzellen und einer erhöhten neuronalen und retinalen Apoptose, sowie zu Problemen bei der Gehirn- und Augenentwicklung (Abb. 1.6) (Chen *et al.*, 2010).

Im Medulloblastom wurde Nestin vor allem im Zusammenhang mit dem Shh Subtyp erwähnt. Rao *et al.* beschreiben, dass Nestin exprimierende neuronale Vorläuferzellen zum Zeitpunkt der Geburt als Ursprungszellen für Medulloblastome erachtet werden können (Rao *et al.*, 2003). Neben dem Medulloblastom wird Nestin auch im Colorektalkarzinom (Teranishi *et al.*, 2007) und anderen gesunden Geweben wie den Ovalzellen der Leber (Sun und An, 2004), epithelialen Vorläuferzellen des Pankreas (Esni *et al.*, 2004; Treutelaar *et al.*, 2003),

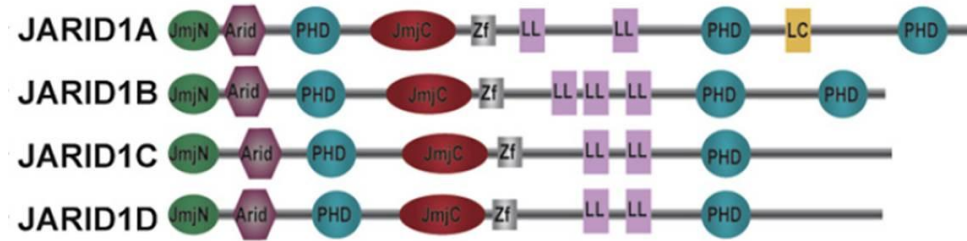
pankreatischen Stellarzellen (Lardon *et al.*, 2002) oder gastrointestinalen Stromazellen (Tsujimura *et al.*, 2001) exprimiert.

1.2 Die Histondemethylase JARID1C und ihre Rolle in Krebserkrankungen

Die Informatiker Benjamin Schowe und Katharina Morik entwickelten 2011 eine neue Methode zur Merkmalsselektion, die sie auf mRNA-Profile primärer Neuroblastome anwandten (Schowe, 2011). Diese informatische Methode wurde genutzt, um Gene zu identifizieren, die in aggressiven Neuroblastomen unabhängig von MYCN reguliert sind. Eines der so identifizierten Gene ist die Histondemethylase JARID1C.

Die Basiseinheit von Chromatin besteht aus 146 bp von DNA die um Histonoktamere, aus jeweils zwei Kopien der vier Histone H2A, H2B, H3 und H4 gewickelt sind. Nachdem lange Zeit vermutet wurde, dass der Methylierungsstatus von Histonen irreversibel und somit nicht funktionell sei, wurde die lysinspezifische Demethylase 1 (LSD 1) entdeckt, die H3K4 und H3K9 demethyliert (Shi *et al.*, 2004). Im Neuroblastom zeigte sich, dass LSD1 in wenig differenzierten Primärtumoren stark exprimiert wird und eine Inhibition des Proteins in Zelllinien oder Xenografts zu verlangsamtem Wachstum führt (Schulte *et al.*, 2009). Allerdings ist die Aktivität von LSD 1 auf die Katalyse von di- und monomethylierten Lysinen beschränkt. Daher wurde schon früh die Existenz weiterer Histondemethylasen vermutet. Klose *et al.* identifizierten 2006 eine Gruppe von Jumonji C Domänen tragenden Proteinen, die in sieben Familien eingeteilt werden können (Klose *et al.*, 2006). Eine dieser Jumonji C tragenden Gruppen ist die JARID Familie, die sich wiederum in die Subgruppen JARID1 und JARID2 spaltet (Klose *et al.*, 2006). Die JARID1 Gruppe hat vier Mitglieder: JARID1A (RBP2, KDM5A), JARID1B (PLU1, KDM5B), JARID1C (SMCX, KDM5C) und JARID1D (SMCY, KDM5D).

Der Methylierungsstatus von Arginin oder Lysin an den verschiedenen Histonen steht in Verbindung mit der transkriptionellen Genregulationen. Eine Trimethylierung des Lysins 4 am Histon 3 (H3K4) ermöglicht die Bindung der RNA Polymerase II an DNA (Vermeulen *et al.*, 2007). Generell hängt die transkriptionelle Aktivierung oder Repression der Gene vom Methylierungsgrad der Histone an verschiedenen Lysinen ab. Methylierungen an H3K9, H3K27 und H4K20 werden vor allem mit Genrepression assoziiert, wohingegen die Methylierung von H3K4, H3K36 und H3K79 der Aktivierung der Genexpression dienen (Martin und Zhang, 2005).



Verändert nach Christensen et al., 2007

Abbildung 1.7 – Schematische Darstellung der humanen JARID1 Familie: Alle Mitglieder der JARID1 Familie beinhalten eine JmjN (Jumonji N) Domäne, eine AT-reiche interaktive Domäne (ARID), zwei bis drei *Plant-homeo-domains* (PHD), einer JmjC (Jumonji C) Domäne und eine C₅HC₂ Zinkfinger Domäne (Zf).

Neben gesundem Gewebe wurden alle Mitglieder der JARID1 Familie in Zusammenhang mit Krebserkrankungen gebracht. JARID1A wird im Magenkarzinom (Zeng *et al.*, 2010) und Gebärmutterhalskrebs überexprimiert (Hidalgo *et al.*, 2005). Auch JARID1B wird als Onkogen betrachtet, es wird in Brustkrebs (Lu *et al.*, 1999), Prostatakrebs (Xiang *et al.*, 2007), Blasen- und Lungenkrebs (Hayami *et al.*, 2010) überexprimiert und fördert im Melanom die Tumorprogression (Roesch *et al.*, 2010). JARID1D hingegen wird als Tumorsuppressor beschrieben, da sich im Prostatakarzinom eine Deletion des Gens findet

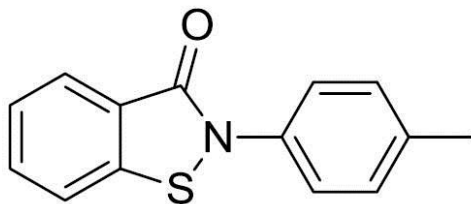


Abbildung 1.8 – Strukturformel von Pbit: 2-(4-Methylphenyl)-1,2-Benzisothiazol-3(2H)-on wurde als Inhibitor für JARID1B und JARID1C in Brustkrebszellen vorgestellt (Sayegh *et al.*, 2013)

(Perinchery *et al.*, 2000). Diese Arbeit konzentriert sich vor allem auf JARID1C, welches bisher mit Nierenzellkarzinom (Dalglish *et al.*, 2010) und Gebärmutterhalskrebs (Smith *et al.*, 2010) in Verbindung gebracht wurde.

JARID1C ist ein 180 kDa großes Protein, welches zunächst als Ursache für X-chromosomale mentale Retardierung beschrieben wurde (Jensen *et al.*, 2005). Als Ursache dafür stehen bis zu 14

Mutationen (Tzschach *et al.*, 2006). JARID1C demethyliert das Trimethyl und Dimethyl an H3K4 (Iwase *et al.*, 2007).

2013 wurde in einem Hochdurchsatzscreening ein JARID1B Inhibitor entwickelt, der auch JARID1C inhibiert (Sayegh *et al.*, 2013). Dieser Inhibitor, N-Phenylbenzisothiazolinon (Pbit), vermindert die Demethylierung in Brustkrebszelllinien (Sayegh *et al.*, 2013), sodass die Analyse der funktionellen Konsequenzen einer JARID1C-Inhibition in Tumorzellen möglich wird.

2. Ziele der Arbeit

Der MYCN-Status ist eine entscheidende Determinante für die Aggressivität vieler Tumorzellen. Ziel dieser Dissertation war eine MYCN Abhängigkeit bzw. Unabhängigkeit in der pädiatrischen Tumorgenese zu analysieren. Folgende Fragestellungen wurden dabei bearbeitet:

1. Können wir im Neuroblastom MYCN unabhängige Faktoren identifizieren, die die Progression aggressiver Tumore fördern?

Hierzu wurde die durch bioinformatische Methoden identifizierte Histondemethylase JARID1C untersucht, die in Hochrisikopatienten mit Neuroblastom unabhängig von MYCN exprimiert wird. Die Eigenschaften und Funktion des Proteins sollten in ausgewählten Neuroblastomzelllinien untersucht werden.

2. Lässt sich durch die Verwendung gezielt ausgewählter Promotoren die MYCN getriebene Tumorgenese pädiatrischer Krebserkrankungen in der Maus modellieren?

Gewebsspezifische Aktivierung von MYCN in der Maus war für die Generierung von Neuroblastomen erfolgreich (Althoff *et al.*, 2014). Daher sollte hier untersucht werden, ob sich durch die Aktivierung von MYCN unter der Kontrolle von den spezifischen Promotoren GFAP-Cre, Nestin-Cre und Math1-Cre, andere pädiatrische Tumormodelle generieren lassen. Die entstehenden Tumore sollten phänotypisch charakterisiert werden und durch Anwendung von Biolumineszenz-Bildgebung, MicroArrays und aCGH molekular untersucht werden. Aus Tumoren sollten pädiatrische Modelle entwickelt werden, in denen das Wachstum MYCN abhängiger Tumorzellen durch gezielte Inhibition gehemmt werden kann.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Antikörper, siRNA und Inhibitoren

Primärantikörper	Hersteller	Verdünnung	Blockierung
rb α JARID1C	Bethyl Labs, USA, # A301-035A	1:100 (WB)	10 % Milch
		1:1000 (IHC)	10 % BSA
mo α β -Aktin	Sigma, USA # A5441	1:5000 (WB)	10 % Milch
rb α H3K4me3	Abcam, # 8580	1:2000 (WB)	10 % Milch
rb α H3K4me2	Abcam, # 32356	1:2000 (WB)	10 % Milch
rb α H3K4me1	Abcam, #ab 8895	1:500 (WB)	10 % Milch
rb α H3	Cell Signaling, # 9715	1:2000 (WB)	10 % Milch
rb α GAPDH	Merck /Millipore, #MAB374	1:500 (WB)	10 % Milch
mo α MYCN	Santa Cruz, # sc-53993	1:500 (WB)	10 % Milch
rb α Chromogranin A	Abcam, #ab 15160	1:300 (IHC)	2 % BSA
rb α Ki 67 Klon SP6	Abcam, #ab 16667	1:100 (IHC)	2 % BSA
rb α Glucagon	Novocastra, #NCL-GLUCp	1:25 (IHC)	2 % BSA
Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung	
do α rabbit IgG HRP	GE Healthcare, Freiburg, D # NA9340V	1:1000 (WB)	
sh α mouse IgG HRP	GE Healthcare, Freiburg, D # NA9310V	1:1000 (WB)	
do α rabbit - Cy 3 IgG	Sigma, USA # C-2306	1:1000 (IHC)	
siRNA	Sequenz (5' > 3')	Firma	
siJARID1C	ACGGCGGATCTTGGACCTCTA	Qiagen, Hilden, D	
AllStars Neg. siRNA AF488		Qiagen, Hilden, D	
Inhibitoren	Herkunft		
Pbit	Xcess Bioscience Inc, USA		
JQ1	BPS Bioscience, Hamburg, D		
MLN 8237	Absource Diagnostics GmbH, München, D		

3.1.2 Verwendete Primer und PCR Bedingungen

Primer	Sequenz (5'> 3') bzw. Bestellnummern	Firma	Amplikon	Programm
GAPDH	CATCAAGAAGGTGGTGAAGC GAGCTTGACAAAGTGGTCGT	Eurofins Genomics GmbH, Ebersgerb, D		qPCR 1
JARID1C	QT 01666931	Qiagen, Hilden, D		qPCR 1
Malat1	(AB) HS 00273907	Qiagen, Hilden, D		qPCR 2
GFAP- Cre	ACTCCTTCATAAAGCCCT ATCACTCGTTGTCATCGACCG	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, D	190 bp	2
Lsl- MYCN	ACCACAAGGCCCTCAGTACC TGGGACGCACAGTGATGG	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, D	168 bp	1
Math1- Cre	TCCGGGCTGCCACGACCAA GGCGCGGCAACACCATTTT	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, D	450 bp	1
SmoM2	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT GCGAAGAGTTTGTCTCAACC GGAGCGGGAGAAATGGATATG	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, D	300 bp (tg)/ 550 bp (wt)	1
Nestin- Cre	GCGGTCTGGCAGTAAACTATC GTGAAACAGCATTGCTGTCACTT	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, D	100 bp	1
Lsl - „flox-out“	GCGGGCATGACTTCTGCGCT CCTCCAGCATCTTCACAGGTCC (Althoff et al, 2014)	Eurofins Genomics GmbH, Ebersberg, D	2241 bp/ 703 bp	3

qPCR 1: 20 s 95 °C, 3 s 95 °C, 30 s 60 °C, 40 Zyklen

qPCR 2: 20 s 95 °C, 1 s 95 °C, 20 s 60 °C, 40 Zyklen

Programm 1: initial 5 min 95 °C, 10s 95°C, 15s 60°C, 10s 72°C, 39 Zyklen, final 5 min 72°C

Programm 2: initial 5 min 95 °C, 10 s 95 °C, 15 s 56 °C, 10 s 72 °C, 39 Zyklen, final 5 min 72 °C

Programm 3: initial 5 min 95 °C, 30 s 95 °C, 3 min 67,7°C, 40 s 72 °C, 39 Zyklen, final 10 min 72 °C

3.1.3 Verwendete Mauslinien

Offizieller Name	Name	Herkunft
B6129S6F1-Gt(ROSA)26Sortm2384 (CAG-loxP-STOP-loxP-MYCN)Arte	Lsl-NYMC	Prof. Dr. J.H. Schulte, UK Essen
Gt(ROSA)26Sortm1(Smo/EYFP)Amc/J	SmoM2	PD Dr. U. Schüller, TU München
FVB-Tg(GFAP-cre)25Mes	GFAP-Cre	The Jackson Laboratory, USA
Tg(Atoh1-cre)1Bfri/J	Math-1-Cre	PD Dr. U. Schüller, TU München
B6.Cg(SJL)-TgN(NesCre)1Kln	Nestin-Cre	The Jackson Laboratory, USA

3.1.4 Lösungen und Puffer

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	
<i>Zellkultur</i>		
Neuroblastomzellmedium	RPMI	
	FCS	10 % (v/v)
	Amphotericin	1 % (v/v)
	PenStrep	1 % (v/v)
Glukagonomzellmedium	DMEM - hoch im Glucose und Pyruvatanteil	
	FCS	10 % (v/v)
	Amphotericin	1% (v/v)
	PenStrep	1% (v/v)
	Natriumpyruvat	1% (v/v)
	L-Glutamin	1% (v/v)
Einfriermedium	FCS	
	DMSO	10% (v/v)

Fortsetzung Tabelle 3.1.4 Lösungen und Puffer

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	
MTT-Reagenz	Thiazolylblau	0,1 mM
	PBS	
MTT Lysepuffer	SDS	10 % (w/v)
	Essigsäure	0,6 % (v/v)
	DMSO	
<i>Biochemie und Molekularbiologie</i>		
TEN Puffer	Triton X 100	0,005 % (v/v)
	PMSF	2 mM
	NaN ₃	0,0002 % (v/v)
	PBS	
Laufpuffer (10x)	Tris	125 mM
	Glycin	960 mM
	SDS	0,005 %
MES-Laufpuffer (20x)	MES	50 mM
	Tris Base	50 mM
	SDS	0,001
	EdtA	1 mM
	aqua bidest	
RIPA	Hepes	50 mM
	NaCl	150 mM
	NP-40	1 % (v/v)
	Triton	1 % (v/v)
	SDS	1 % (w/v)
	complete®	1 Tablette

Fortsetzung Tabelle 3.1.4 Lösungen und Puffer

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	
Ladepuffer	Tris-HCL	106 mM
	Tris Base	141 mM
	Lithiumdodecylsulfat	0,02 % (v/v)
	EDTA	0,51 mM
	Glycerin	0,1 % (v/v)
	Coomassie Blau (1%)	0,22 mM
	Phenolrot (1%)	0,175 mM
	aqua bidest	add 10 ml
Upper Tris	Tris Base	0,5 M
	SDS	0,004
	aqua bidest	
	pH 6,8	
Lower Tris	Tris Base	1,5 M
	SDS	0,004 % (v/v)
	aqua bidest	
	pH 8,8	
Transferpuffer Westernblot "Anode1 "	Tris Base	0,3 M
	Methanol	20 % (v/v)
	aqua bidest	
Transferpuffer Westernblot "Anode2 "	Tris Base	25 mM
	Methanol	20 % (v/v)
	aqua bidest	
Transferpuffer Westernblot "Kathode "	Tris Base	25 mM
	Glycin	40 mM
	Methanol	10 % (v/v)
	SDS	0,005 % (w/v)
	aqua bidest	

Fortsetzung Tabelle 3.1.4 Lösungen und Puffer

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	
Ponceau	Ponceau S	5 g/l
	Essigsäure	1 % (v/v)
	aqua bidest	
Sammelgel (4 %)	Acrylamid	0,52 ml
	Lower-Tris Puffer	1 ml
	Ammoniumpersulfat	20 µl
	Tetramethylethyldiamin	4 µl
	aqua dest	2,48 ml
Trenngel (11 %)	Acrylamid	3,3 ml
	Upper-Tris Puffer	2,5 ml
	Ammoniumpersulfat	50 µl
	Tetramethylethyldiamin	5 µl
	aqua dest	4,2 ml
Trenngel (13 %)	Acrylamid	4,3 ml
	Upper-Tris Puffer	2,5 ml
	Ammoniumpersulfat	50 µl
	Tetramethylethyldiamin	5 µl
	aqua dest	3,2 ml
TBS (10x)	Tris Base	250 mM
	NaCl	1,5 M
	pH 7,4	
Blockierlösung (Western Blot)	Tris HCl	50 mM
	NaCl	80 mM
	CaCl ₂	2 mM
	MP-40	0,2 % (v/v)
	Magermilchpulver	5 % (w/v)
	aqua dest	

Fortsetzung Tabelle 3.1.4 Lösungen und Puffer

Puffer/ Lösung	Zusammensetzung	
Sonifizierungspuffer	Tris Base	50 mM
	EdtA	10 mM
	SDS	1 % (w/v)
	complete ®	1 Tablette
	Pmsf	1mM
<i>Histologie</i>		
Blockierlösung (Zellen)	PBS	
	Tween	0,5 % (v/v)
	FCS	10 % (v/v)
Blockierlösung (Gewebe)	PBS	
	FCS	2 % (v/v)

3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Hersteller
Agarose-Gelelektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Agilent Scanner G2505C	Agilent Technologies, Böblingen, D
Axiovert 25C Mikroskop	Zeiss, Oberkochen, D
Benchmark Färbeautomat	Roche, Indianapolis, USA
Biodoc Analyzer Geldokumentation	Biometra, Göttingen, D
Bioruptor Sonication System UCD 300-Bioruptor Next Generation System	Diagenode, Seraing, Be
Centrifuge 5415c	Eppendorf, Hamburg, D
EL-800 Microplate Reader	Bio-tek Instruments, Bad Friedrichshall, D
FC 500 Flow Cytometer	Beckman Coulter, Krefeld, D
Gelgießstation	Biorad Laboratories, München, D
Hyperenter XP Einbettautomat	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Inkubator	Binder, Tuttlingen, D
Ivis Lumina II	Perkin Elmer,

Fortsetzung Tabelle 3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Geräte	Hersteller
Multipette Stream	Eppendorf, Hamburg, D
NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
PerfectBlue™ Semi-Dry Electroblotter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Photometer	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, D
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
RM5- Assistant Rollschüttler	Braun, Melsungen, D
Rotaxia 50 RS Zentrifuge	Hettich, Mülheim a.d. Ruhr, D
Spannungsgeber MS-Major Science MP-3AP	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt, D
StepOne Plus Real-Time PCR	Applied Biosystems, Carlsbad, USA
Sterilbank	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim, D
Thermal Cycler C1000	Biorad Laboratories, München, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
UVIchemi Chemiluminescence Documentation System	Uvitec Biometra, Göttingen, D
Vortex	Heidolph, Schwabach
Westernblotkammer - gegossene gele	Biorad Laboratories, München, D
Xcell SureLock - Novex MiniCell System	Life Technologies, Darmstadt, D
Z1 Couter Partikel Counter	Beckman Coulter, Krefeld, D
Kleine Zentrifuge: r=7,3 cm	
Große Zentrifuge: r=21,1 cm	
Material	Hersteller
Blotting- Papier, 3 mm Dicke	Whatman, Dassel, D
Combitips (2,5 ml; 5 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Cryoröhrchen	Simport, CA
Deckgläschen	Menzel-Gläser, Braunschweig, D
Reaktionsgefäße (0,2ml, 0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Einwegpipetten (5 ml; 10 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Einwegspritzen (20ml)	Teumo Europe N.V., Leuven, Be
E-Plate 96 (Xcelligence)	Roche, Indianapolis, USA

Fortsetzung Tabelle 3.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Halbmicro Einwegküvetten	Lab Logistic Group GmbH, Meckenheim, D
Kanülen (20G; 0,9 mm)	Becton Dickinson, Fraga, Esp
Kanülen (27G; 0,4 mm)	Becton Dickinson, Drogheda, Irl
Microcon YM-10 Zentrifugier Filter	Sigma Aldrich, USA
NuPage Fertiggele	Life Technologies, Darmstadt, D
Objektträger	Engelbrecht, Edermünde, D
Objektträger, zweifach Gekammert	Nalge Nunc International, New York, USA
Ohrlochzange	Finescience Tools, Heidelberg, D
Parafilm	Pechinery, USA
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, D
Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg, D
PP-Röhrchen	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Protran BA 85 Nitrocellulose transfer membran, 0,2 µm pore size	Whatman, Dassel, D
Skalpelle	Servopax, Wesel, D
Zellkulturflaschen 25 cm ³ ; 75 cm ³	Corning, Kaiserslautern, D
Zellkulturplatten 12-Well; 96 Well	CytoOne, Hamburg, D
Zentrifugenröhrchen	Beckman Coulter, Krefeld, D

3.1.6 Kommerzielle Anwendungen, Isolierungs- und Aufreinigungssysteme

Systeme	Bestellnummer	Hersteller
Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	RPN 2232	GE Healthcare
Cell Death Detection ELISA plus	11774425001	Roche, Mannheim, D
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	11647229001	Roche, Mannheim, D
High Pure RNA Isolation Kit	11828665001	Roche, Mannheim, D
Mercodia Glucagon Elisa	10-1271-01	Mercodia, Uppsala, Schweden
Mercodia Mouse Insulin ELISA	10-1247-01	Mercodia, Uppsala, Schweden
peqGOLD Tissue DNA-Mini Kit (S-Line)	12-3396-01	PeqLab
Rneasy Micro Kit (50)	74004	Qiagen, Hilden, D
Transcription First Strand cDNA Synthese Kit	4897030001	Roche, Mannheim, D

3.1.7 Kommerzielle Lösungen, Substanzen und Chemikalien

Substanz	Hersteller
180K Array AMADID 027411	Agilent, USA
1x PBS	Invitrogen, Karlsruhe, D
Acrylamid	Roth, Karlsruhe, D
Agarose	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, USA
Amphotericin	PAA, Pasching
Aqua bidest 10 ml Mini-Plasco	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, USA
Bradford Reagenz	Roth, Karlsruhe, D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Roth, Karlsruhe, D
complete, Mini Protease Inhibitoren	Roche, Mannheim, D
Coomassieblau	Serva, Heidelberg, D
Cy3 (Array cGH)	Perkin Elmer, Rodgau
Cy5 (Array cGH)	Perkin Elmer, Rodgau
DAPI	Roth, Karlsruhe, D
DEPEX	Fluka, Schweiz
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, D
Direct PCR Tail Kit	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D

Fortsetzung Tabelle 3.1.7 Kommerzielle Lösungen, Substanzen und Chemikalien

Substanz	Hersteller
DMEM - hoch in Glucose und Pyruvat	Gibco Life Technologies, Darmstadt
Eosin, alkoholisch	Sigma Aldrich, USA
Essigsäure	Roth, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Merck, Darmstadt, D
Fast Start Universal Sybr Green Master Mix	Roche, Mannheim, D
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Pasching, D
Forene (Isofluran) 100% (v/v)	AbbVie Deutschland GmbH & Co KG, Ludwigshafen, D
Glycerin	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Hämalaun, sauer	Chroma Technology Corp, USA
HiPerFect	Invitrogen, Karlsruhe, D
Histo-Clear I	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Histo-Clear II	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Immunmount	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	Sigma Aldrich, USA
Isotonlösung für FACS und Counter	Beckman Coulter, Krefeld, D
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe, D
100 bp DNA Marker	Invitrogen, Karlsruhe, D
Proteinladder	Invitrogen, Karlsruhe, D
Methanol	VWR International, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, D
NP 40	Sigma Aldrich, USA
Paraformaldehyd, 4%ig	Morphisto, Frankfurt a.M, D
My Taq DNA Polymerase Mix	Bioline, USA
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, D
Phenolrot	Sigma Aldrich, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, USA
Ponceau S	Serva, Heidelberg, D
Propidiumiodid	Sigma Aldrich, USA

Fortsetzung Tabelle 3.1.7 Kommerzielle Lösungen, Substanzen und Chemikalien

Substanz	Hersteller
Proteinase K	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
Random Primer (Array cGH)	Life Technologies, Darmstadt, D
Rinderserumalbumin (BSA)	New England Biolabs, Frankfurt, D
RNAse A	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, D
RPMI 1640-Medium	Schülke, Norderstedt, D
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Serva, Heidelberg, D

3.1.8 EDV

Software	Hersteller
Biodoc Analyze	Biometra, Göttingen, D
CXP Software 2.0	Beckman Coulter, Krefeld, D
GraphPad Prism, Version 5.0	GraphPad Software, Inc., USA
Feature Extraction v10.1.1.1	Agilent Technologies, Böblingen, D
Motic Fotoverarbeitung	Motic, Wetzlar, D
Office 2012	Microsoft, USA
Partek genomics Suite 6.6	Partek inc., USA
Photoshop CS2	Adobe, USA
UVIchemi version 12.3 for Windows	Biometra, Göttingen, D

Internetportale/ Datenbanken	Webside
Datenbank zur Auswertung von aCGH	http://medgen.urgent.be/arraycghbase
GEO Datenbank	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/
R2 Datenbank	http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi
Histologischer Hirnatlas der Maus	http://ctrngenpath.net/static/atlas/mousehistology/

3.2 Methoden

3.2.1 Methoden der Zellkultur

3.2.1.1 Kultivierung etablierter Tumorzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien SHEP, NB69, IMR5 und IMR32 wurden ursprünglich aus Primärtumoren entwickelt. Aus einer Knochenmarksmetastase wurden die Neuroblastomzelllinie SK-N-SH, sowie ein Subklon mit epithelialem Phänotyp gewonnen (Biedler *et al.*, 1978). SHEP Zellen weisen keine MYCN Amplifikation vor. Die NB69 Zelllinie, die ebenfalls keine MYCN Amplifikation aufweist, wurde aus der Hirnmetastase eines 16 Monate alten männlichen Patienten mit einem Neuroblastom gewonnen (Feder und Gilbert, 1983). Die MYCN amplifizierte Zelllinie IMR32 wurde 1970 aus einem abdominalen Neuroblastom eines 13 Monate alten kaukasischen Jungen entwickelt (Tumilowicz *et al.*, 1970). IMR5, die zweite MYCN amplifizierte Zelllinie, ist ein Sub-Klon von IMR32.

3.2.1.2 Kultivierung primärer Tumorzellen

Der Pankreastumor einer doppelt-transgenen Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus wurde unter sterilen Bedingungen aus der Maus entfernt, in ca. 1 mm große Teile zerkleinert und für 30 Minuten bei 37 °C in Liberase DL (Roche) inkubiert. Anschließend wurde serumhaltiges Medium zugegeben und der Ansatz durch auf- und abpipettieren geschert. Der Überstand wurde daraufhin abgenommen und zentrifugiert. Der Überstand sowie das Pellet wurden jeweils in frisches Medium aufgenommen und auf eine 6-Well Platte übertragen. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt und nach einigen Tagen wurden die ausgetretenen Zellen in Zellkulturflaschen überführt. Aus der entstandenen Zelllinie wurden Einzelzellklone angefertigt. Um dies zu erreichen wurde die Zellsuspension so weit verdünnt, dass sich nur noch eine Zelle auf 100 µl in eine 96-Well Platte fand. Die klonal entstandenen Zellen wurden nach ihrem Phänotyp in differenzierte und undifferenzierte Zellen unterteilt.

In Vorbereitung auf Experimente wie Transfektion, Western Blot, FACS, MTT, Elisa und RNA Gewinnung wurden die Zellen in 12- oder 96-Well Platten ausgesät. Damit dies kontrolliert und gleichmäßig geschehen konnte, wurden die Zellen zunächst gezählt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde der *Coulter Counter* der Firma Beckman genutzt. Auf dieser Grundlage wurden die Zellen zu 25.000 Zellen/ml (SHEP, sowie alle Pankreazelllinien) und

50.000 Zellen/ml (IMR5) ausgesät und bis zum Zeitpunkt der weiteren Behandlung im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

3.2.1.3 Transfektion von Nukleinsäuren durch Lipofektion

Bei der Lipofektion werden Fremd-DNA oder –RNA durch Liposomen in Zellen eingebracht. Um die Bedeutung der Histondemethylase JARID1C für Neuroblastomzellen zu bestimmen, wurde in diesem Fall *short interfering* (si-) bzw. *scrambled* (scr-) RNA mit Hilfe des *HiPerFect Transfection reagent* (Qiagen) in Neuroblastomzellen eingeschleust. Die Reagenzien wurden, wie in Tabelle 3.2.1 aufgeführt, in FCS- und antibiotikafreiem Medium angesetzt und in Medium mit 5 % FCS und ohne Antibiotika gelöst. Die Ansätze verblieben für 24 Stunden auf den Zellen, danach wurden die Zellen wieder mit normalem Medium versorgt. Analysen wurden 24 bzw. 48 Stunden nach Mediumwechsel durchgeführt.

Tab. 3.2.1: Pipettierschema der siRNA Transfektion

	unbehandelt	0-Kontrolle	scrRNA	siRNA
RNA	-	-	20 µM	20 µM
Transfektionsreagenz	-	6 µl/ml	6 µl/ml	6 µl/ml
Medium (ohne Zusätze)	100 µl/ml	94 µl/ml	92 µl/ml	92 µl/ml

3.2.1.4 Messung der Zellviabilität mit Hilfe von Tetrazoliumsalz (MTT)

Die Messung der Zellviabilität mit Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; MTT) wurde 1983 von Tim Mosmann entwickelt (Mosmann, 1983). Die Methode beruht auf der Reduktion der ursprünglich gelben Lösung zu einem blauen Formazan (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid). Während lange geglaubt wurde, dass dieser Prozess von der Zellatmung abhängig ist und durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen bewirkt wird (Mosmann, 1983), zeigte sich später, dass die Reduktion von NADH und NADPH und somit weitgehend unabhängig von Succinat hervorgerufen wird (Berridge und Tan, 1993).

Zellen wurden in 96-Well Platten ausgesät und zum gewünschten Zeitpunkt mit 50 µl MTT-Lösung versehen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37 °C wurde diese

abgesaugt und 100 µl des MTT-Lysepuffer aufgegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Platten im Elisa-Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm ausgelesen. Die Höhe der gemessenen Extinktion ist proportional zur Anzahl lebender Zellen.

Durch eine Reihe von MTTs wurde die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) des JARID1C Inhibitors Pbit auf SHEP und IMR5 Zellen, bzw. dem BRD4 Inhibitor JQ1 und dem Aurorakinaseinhibitor M8237 auf Pankreaskarzinomzellen ermittelt. Hierfür wurden die Zellen in eine 96-Well Platte ausgesät und mit aufsteigenden Konzentrationen zwischen 1 µM und 20 µM (Pbit), 1 – 1000 µM (KDM5-C49) oder 0,01 – 10 µM (JQ1 und MLN 8237) behandelt. Als Kontrolle dienten mit DMSO behandelte Zellen. Die Reagenzien verblieben für 72 Stunden auf den Zellen, bevor durch Zugabe von MTT Lösung, die Viabilitätsmessung gestartet wurde.

3.2.1.5 Bestimmung der Zellviabilität durch Durchflusszytometrie mit Propidiumiodid

Die Durchflusszytometrie (FACS, *fluorescence activated cell sorting*) wurde in dieser Arbeit als eine weitere Möglichkeit der Messung der Zellviabilität genutzt. Mit ihrer Hilfe wurden die Auswirkungen der siRNA bzw. Inhibitorbehandlung auf Neuroblastom- oder Pankreaskarzinomzellen ermittelt, wobei unbehandelte und mit DMSO bzw. Transfektionsreagenz behandelte Zellen die Kontrollen darstellten.

Zur Vorbereitung der Messung wurden die Zellen kultiviert und behandelt. Das auf den Zellen befindliche Medium sowie die mit Trypsin geernteten Zellen wurden in FACS Röhrchen überführt. Nach zwei Waschschritten mit kaltem PBS wurden die Zellen in einer eiskalten 70 %igen Ethanollösung für mindestens eine Stunde bei 4 °C fixiert. Im Anschluss daran erfolgten ein weiterer Waschschriff und eine einstündige Inkubation der Zellen in PBS unter Zugabe von RNase A (0,2 mg/ml). Daraufhin wurde Propidiumiodid zugegeben (10 µg/ml) und die Messung gestartet. Ausgewertet wurden die Daten im Anschluss mit der CXP Software Version 2.0 der Firma Beckman Coulter.

3.2.1.6 Nachweis von Proliferations- und Apoptoseraten durch Elisa Assays

Zur Bestätigung der Proliferations- bzw. Apoptose Ergebnisse wurden die Elisa Kits – *Cell Proliferation ELISA* Kit und *Cell death Detection ELISA (Plus)* Kit der Firma Roche–

verwendet. SHEP bzw. IMR5 Zellen wurden im 96-Well Maßstab ausgesät und mit JARID1C siRNA behandelt. Unbehandelte bzw. mit Transfektionsreagenz oder *scrambled* RNA behandelte Zellen dienten als Kontrolle.

Das *Cell Death Detection* Kit verwendet Antikörper, die für DNA und Histone spezifisch sind. Der erfolgende Farbausschlag korreliert mit dem Anteil apoptotischer Zellen. Das *Cell Proliferation* Kit hingegen beruht auf dem Einbau von BrdU (5-Bromo-2-Deoxyuridin) in die DNA. Das BrdU wird dabei anstelle des Thymidins in die DNA eingebaut. Die Menge des eingebauten BrdUs ist proportional zur Zellzahl. Die Versuche wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.2 Mauslinien und tierexperimentelle Arbeiten

3.2.2.1 Tierhaltung

Alle im Rahmen dieser Arbeit gezüchteten Mäuse (s. 3.7.3) wurden im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikums Essen gehalten. Die Mäuse lebten in Makrolonkäfigen Typ II (360 cm²), bei einem Hell-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden und einer Temperatur von 22 ⁺/- 2 °C. Futter und Wasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung.

3.2.2.2 Genotypisierung transgener Tiere

Alle Tiere wurden markiert, und zwischen dem fünften und achten postnatalen Tag wurde eine Schwanzbiopsie entnommen. Im Alter von drei Wochen wurden die Tiere nach Geschlechtern getrennt abgesetzt. Aus dem Gewebe der Schwanzbiopsien wurde unter Einsatz von *Direct PCR Tail* Reagenz (Peqlab) und der Proteinase K (Peqlab) genomische DNA gewonnen. Mit Hilfe von PCR wurden die jeweiligen Amplikons (vergl. Tab. 3.1.2) vervielfältigt und auf einem Agarosegel nachgewiesen.

Um das Herausschneiden der Polyadenyl-Stoppsequenz aus Gewebe mit Cre-Aktivität nachzuweisen, wurde eine „*flox-out*“ PCR durchgeführt (vergl. Tab. 3.1.2). Kommt es zur Aktivität der Cre-Rekombinase, wird in betroffenen Zellen die Stoppsequenz aus der DNA ausgeschnitten, sodass in der PCR ein Amplikon von 704 bp erkennbar wird. Kommt es nicht zum Ausschneiden der Sequenz, findet sich ein Amplikon von 2241 bp.

3.2.2.3 Gewinnung von Gewebe für histologische, biochemische und molekularbiologische Analysen

Versuchstiere wurden durch Überdosierung des Inhalationsnarkotikums Isofluran (AbbVie) getötet. Vor der Organentnahme für Histologie und biochemische oder molekularbiologische Untersuchungen des Gewebes wurden die Tiere zunächst mit PBS perfundiert. Dafür wurde eine Kanüle (27G) in die linke Herzkammer eingeführt und die untere Hohlvene (*Vena cava superior*) mit einer feinen Schere durchtrennt. Mit konstantem Druck wurden 10 ml PBS durch den Körper gespült. Die Gewebe wurden daraufhin in flüssigen Stickstoff bzw. 4 % PFA überführt.

Die Gewinnung von Pankreata für spätere molekularbiologische Untersuchungen gestaltete sich durch den hohen RNase Gehalt des Organs als schwierig. So findet sich zum Beispiel im Pankreas einer erwachsenen Ratte ein RNase A Level von 200 µg/g (Beintema *et al.*, 1973).

3.2.2.4 Generierung von Xenografts von Pankreaskarzinomzellen und Behandlung mit JQ1

2×10^7 Tumor-Zellen wurden in 250 µl Matrigel aufgenommen und subkutan in die Flanke von thymuslosen Nacktmäusen appliziert. Das Tumorwachstum wurde alle 48 Stunden mit einer Schiebelehre kontrolliert. Sobald die Tumore ein Volumen von einem Kubikzentimeter erreicht hatten, wurden die Tiere durch Narkosemittelüberdosierung getötet und die Tumore entfernt. Diese wurden zur Hälfte bei -80 °C gelagert und zur Hälfte wieder in Kultur genommen, um zu beobachten ob sich der Zellphänotyp verändert. Für eine Behandlung mit JQ1 und MLN 8237 wurde eine Teilgruppe von neun Nacktmäusen (nu/nu) bei einer Tumorgöße von ca. 500 mm³ einer forcierte Behandlung unterzogen, wobei drei Tieren JQ1 in einer Konzentration von 50 mg/kg Körpergewicht und drei Tiere MLN 8237 in einer Konzentration von 30 mg/kg Körpergewicht, sechs Mal im Abstand von 12 Stunden intraperitoneal (JQ1) bzw. oral (MLN 8237) appliziert wurde. Die anderen drei Tiere erhielten jeweils intraperitoneal DMSO und bildeten so die Kontrollgruppe. Vier Stunden nach der letzten Dosis wurden die Tiere per Überdosierung von Inhalationsnarkotika getötet, die Tumore entfernt und für weitere Analysen bei -80 °C, für biochemische und molekularbiologische Untersuchungen oder in 4 % PFA, für histologische Untersuchungen gelagert. Die verbliebenen 18 Tiere wurden genutzt um die Wirkung einer langfristigen JQ1 oder MLN 8237 Behandlung zu dokumentieren. Drei Tage nach Zellinjektion, wenn das

Matrigel absorbiert wurde, wurde bei sechs Tieren die JQ1 Behandlung mit 50 mg/kg Körpergewicht und bei sechs Tieren die MLN 8237 Behandlung mit 30 mg/kg Körpergewicht gestartet und alle 24 Stunden wiederholt, bis der Tumor ein Volumen von 1000 mm³ erreichte. Die anderen sechs Tiere der Kohorte wurden mit DMSO behandelt und dienten somit als Kontrollgruppe.

3.2.2.5 *In vivo Imaging* von Luciferase-positiven Tumorzellen

Zur Detektion Luciferase-positiver Zellen wurde durch die Schwanzvene Luciferin (PerkinElmer) in PBS (50 mg/kg Körpergewicht) appliziert. Die Tiere wurden mit 3 % Isofluran in Sauerstoff in Narkose gelegt und in die Kammer des IVIS Lumina II (PerkinElmer) gelegt. In dieser Kammer wurde die Narkose durch 2 % Isofluran in Sauerstoff aufrechterhalten. Bei der Untersuchung der Zelllinien wurde die Luciferase in das Kulturmedium gegeben. Durch die Luciferase kommt es zu einer Oxidation des Luciferins. In Gegenwart von Luciferase wird das Luciferin oxidiert, Teilgruppen werden abgespalten und es kommt zu einer Lichtemission, welche mit der Kamera des IVIS Lumina II aufgezeichnet werden kann.

3.2.2.6 Glukagon- und Insulinbestimmungen aus Mäuseblut

Für die Bestimmung der Glukagon- bzw. Insulinkonzentration im Blut von Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäusen wurden die Tiere zunächst durch Überdosierung eines Inhalationsnarkotikums getötet, postmortem Blut aus dem Herzen entnommen und EDTA-Plasma daraus gewonnen. Anschließend wurden Elisa-Kits der Firma Merckodia genutzt und die Konzentrationen anhand der in den Kits befindlichen Standards bestimmt. Blutwerte von wildtypischen dienten als Referenz für die Blutwerte tumortragender Tiere.

3.2.3 Biochemische Methoden

3.2.3.1 Isolierung von Proteinen und Proteinbestimmung

Zellpellets und Gewebe wurden mit RIPA Puffer unter der Zugabe von *cOmplete* (Roche) lysiert. Alternativ wurden mehrere Zelllysate gleichzeitig im Bioruptor (Diagenode) durch Ultraschall geschert. Die Zellen wurden dafür in Sonifizierungspuffer (s. 3.7.4) geerntet und in Reaktionsgefäßen in das zum Bioruptor gehörende, auf 4°C vorgekühlte Wasserbad überführt. In 60 Zyklen von jeweils 30 Sekunden Ultraschallbehandlung und 30 Sekunden Ruhe wurden die Zellen so lysiert.

Die Proteinbestimmung wurde in Anlehnung an das 1976 von Marion Bradford beschriebene Protokoll durchgeführt (Bradford, 1976). Bindet der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 an Proteine, verschiebt sich sein Absorptionsmaximum von 470 nm auf 595 nm. Diese Verschiebung kann photometrisch gemessen werden. Dazu wurden jeweils 3 µl des Proteinlysats mit 797 µl PBS verdünnt und mit 200 µl Roti-Quant (Roth), welches das Bradford Reagenz enthielt, gemischt und fünf Minuten inkubiert. Die Ergebnisse wurden gegen einen Leerwert normalisiert und der Proteingehalt der Proben anhand einer BSA-Standardreihe ermittelt.

3.2.3.2 SDS Gelelektrophorese nach Laemmli

In der SDS-Gelelektrophorese (oder Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) werden die Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt (Laemmli, 1970).

Für die Gelelektrophorese wurden Gele der Firma Life Technologies oder selbstgegossene Gele von 0,75 mm Dicke verwendet (s. 3.7.4). Es wurden jeweils 30 µg der Proteinlysate mit Ladepuffer versehen. Die Ansätze wurden für fünf Minuten gekocht, um eine Denaturierung der Proteine herbeizuführen. Das im Ladepuffer enthaltene β -Mercaptoethanol führt dazu, dass die noch erhaltenen Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zerstört werden. SDS, das ebenfalls im Puffer zu finden ist, ist ein Detergenz, welches die Proteine umlagert, nichtkovalente Wechselbeziehungen zerstört und die Proteine mit Anionen umhüllt. Die so entstehende negative Ladung der einzelnen Proteine ist proportional zu ihrer Molekülmasse. Die Proben wurden auf das Gel aufgetragen, die Elektrophorese bei einer Spannung von 120V durchgeführt und gestoppt, sobald die Lauffront aus dem Gel herausgelaufen war.

3.2.3.3 Western Blotting

Um die Proteinexpression zu visualisieren, wurden die Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dies erfolgte mit dem *semi-dry* Western-Blot Verfahren. In dem *semi-Dry* Gerät werden Gel und Nitrozellulosemembran zwischen puffergetränkte Filterpapiere gestapelt. Bei einer Stromstärke von 180 mA wurden die Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen.

Die Proteine auf der Membran wurden durch spezifische Antikörper detektiert. Um eine unspezifische Bindung zu vermeiden, musste die Membran zunächst in Blockierlösung inkubieren. Danach erfolgte die Inkubation mit den gewünschten Primärantikörpern bei 4 °C über Nacht, woraufhin die Nitrozellulose mit TBST gewaschen und der Sekundärantikörper aufgetragen wurde. Die Detektion erfolgte mit dem Substrat ECL, welche ein Chemilumineszenz-Signal generiert das am UVIchemi Chemilumineszenz Dokumentationsgerät (Biorad) detektiert und dokumentiert wurde.

3.2.4 Methoden der Molekularbiologie

3.2.4.1 Isolierung von RNA

3.2.4.1.1 Isolierung von RNA aus kultivierten Tumorzellen

Zur Gewinnung von mRNA aus kultivierten Tumorzellen wurde das *High Pure RNA Isolation* Kit der Firma Roche genutzt. Es wurde dabei nach Herstellerangaben vorgegangen. Zur Umschreibung der RNA in cDNA mit Hilfe des *Transcription First Strand cDNA Synthese* Kits, wurden 1000 ng der RNA eingesetzt, das weitere Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers. Nach der RNA Isolierung und nach der cDNA Synthese erfolgte jeweils eine Konzentrationsbestimmung am Nano-Drop Photometer.

3.2.4.1.2 Isolierung von RNA aus Gewebe

Zur Gewinnung von RNA aus Tumor- bzw. Kontrollgewebe wurde das *RNeasy Micro Kit Plus* von Qiagen verwendet. Das Vorgehen erfolgte dabei nach Herstellerangaben.

3.2.4.2 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe

Die Isolierung genomischer DNA wurde mit dem *peqGOLD* Tissue DNA Mini Kit der Firma Peqlab nach Herstellerangaben durchgeführt.

3.2.4.3 Semiquantitative Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde 1985 von Saiki et al. entwickelt (Saiki *et al.*, 1988). Die semiquantitative PCR wurde in einem Ansatz von 20 µl mit Taq-Polymerase (5U/µl) unter Verwendung des zugehörigen 5 x Puffers, 25 mM MgCl₂, sowie 200 µM dNTPs, 20 mM Primer und DNase freiem Wasser durchgeführt. Es wurde jeweils 1 µl DNA eingesetzt.

Um das PCR Produkt analysieren zu können, wurde es auf einem 2 % Agarosegel, das 1,25 µM Ethidiumbromid enthielt, aufgetragen. Ethidiumbromid interkaliert zwischen den DNA-Basen und bildet einen Ethidiumbromid-DNA Komplex. Mit UV-Licht lässt sich der Komplex aus Amplikon und Ethidiumbromid sichtbar machen. Zum Größenabgleich wurde ein 1 kb-Größenmarker aufgetragen.

3.2.4.4 Semiquantitative *real-time* PCR (qPCR)

In ihren Grundzügen beruht die quantitative *real-time* PCR auf der bereits beschriebenen RT-PCR, ermöglicht aber eine genaue Quantifizierung der DNA. Diese Quantifizierung wurde durch eine Messung von Fluoreszenz ermöglicht. Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green* interkaliert in die DNA und die Fluoreszenz steigt proportional mit der Menge an vorhandener DNA. Für die Auswertung der Fluoreszenz muss zunächst der Ct-Wert (*cycle threshold*) bestimmt werden, ein Schwellenwert, der das Ansteigen der Fluoreszenz über den Hintergrundwert beschreibt. Der Ct-Wert der analysierten DNA wurde gegen den Ct-Wert der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) normalisiert. Die relative Produktmenge wurde nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode ermittelt (Livak und Schmittgen, 2001).

3.2.4.5 Array basierte komparative genomische Hybridisierung (aCGH)

Die Array basierte komparative genomische Hybridisierung ist eine Methode zum Nachweis von Verlusten oder Zugewinnen genomischer DNA in einem Gewebe bezogen auf eine Kontrolle. Sie wurde erstmals 1992 von Wissenschaftlern an der Universität von Kalifornien beschrieben (Kallioniemi *et al.*, 1992).

Aus tumortragenden Tieren mit isoliertem Pankreastumor, oder Tieren, die Pankreas- und Hirntumor vorwiesen, wurden die Tumore, sowie die Milz entfernt und mit Hilfe des *peqGOLD Tissue DNA-Mini Kits* der Firma PeqLab DNA daraus gewonnen. Die aus der Milz gewonnene DNA diente als Kontrolle. Zur weiteren Analyse wurde der *180K Array AMADID 027411* von Agilent Technologies genutzt, der das gesamte Mausgenom enthält. Jeweils 400 ng der Tumor-DNA wurden durch Random Primer mit cy3 gelabelt, während die Kontroll-DNA mit cy5 gelabelt wurde. Die Hybridisierung, sowie die Waschschrte erfolgten nach Herstellerangaben. Die Fluoreszenzintensität der Proben wurde am *Agilent Scanner G2505C* gemessen und mit der Software „*Feature Extraction v10.1.1.1*“ wurden die Daten extrahiert. Die Daten wurden dann mit Hilfe der aCGHbase Datenbank weiter bearbeitet. Durch *circular binary segmentation* Algorithmen können die Aberrationen errechnet werden (Olshen *et al.*, 2004).

Diese Analyse wurde für uns im Labor von Frank Speleman (Zentrum für medizinische Genetik am Universitätsklinikum Ghent, Belgien) durchgeführt. Die Auswertungsmethode wurde in einer Publikation von 2013 beschrieben (Kumps *et al.*, 2013). Das Verfahren beruht auf Fluoreszenzmarkierung von DNA, wobei das Verhältnis der Fluoreszenzintensität zwischen Kontrolle und Probe Informationen über chromosomale Aberrationen liefert.

3.2.4.6 mRNA Profiling mit Microarrays

Gen-Chips wie die in dieser Arbeit verwendeten Arrays der Fa. Affymetrix erlauben die parallele Analyse der mRNA Expression einer Vielzahl von Genen. Aus den zu analysierenden Geweben oder Zellen wird zunächst mRNA gewonnen, die durch Reverse Transkriptase in cDNA umgewandelt wird. Auf den für die Analyse verwendeten Gen-Chip, den HuExv1.0 oder MG-U430A, befinden sich angeordnete Oligonukleotide, die kodierende Bereiche des Human- bzw. Maus-Genoms repräsentieren und zu diesen komplementär sind. Die Fluoreszenz-markierte cDNA wird durch Hybridisierung an die Oligonukleotide auf dem

Chip gebunden. Nach einem Waschschrift wird durch Lasertechnik die Fluoreszenz auf dem Chip gemessen, die proportional zur mRNA Expression ist.

Ergebnisse von Gen- oder Exonarrays wurden mit der Web basierten R2-Plattform (vergl. Tab. 3.1.8) analysiert. Für die Analysen in dieser Arbeit wurden Ergebnisse einer Array-Kohorte von 113 primären Neuroblastomen genutzt. Der Datensatz wurde in der GEO-Datenbank des NCBI hinterlegt (GSE: 32664) (Eschenburg *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014). Diese Daten wurden mit Hilfe der PAM Methode ausgewertet (vergl. Kap. 3.2.6.1).

Weiterhin wurden Microarrays genutzt, um mRNA Expression in Pankreas- bzw. Gehirntumoren von Lsl-MYCN;GFAP-Cre Tieren zu untersuchen. Es wurden dabei jeweils drei Pankreastumore, von Tieren die einen isolierten Pankreastumor trugen, bzw. drei von Tieren die einen Pankreas- sowie einen Hirntumor vorwiesen und drei Hirntumore genutzt, um mRNA daraus zu gewinnen. Als Normal-Kontrollen für die Analysen dienten Ergebnisse von Microarray aus der GEO-Datenbank des NCBI (s. 3.2.3).

Die isolierten RNAs wurden im Biochip Labor von PD Dr. Klein-Hitpass am Universitätsklinikum Essen prozessiert. Die Überprüfung von Konzentration und Qualität der mRNA wurde zunächst durch einen RNA6000 Nano Assay auf dem Agilent 2100 Bioanalyzer durchgeführt und nur solche mRNAs für die Chips verwendet, die definierten Qualitätsstandards entsprachen. Für die Umschreibung der mRNA in cDNA wurde das *Gene Chip 3' IVT Express* Kit genutzt. Die Hybridisierung sowie die folgenden Waschschriftte erfolgten nach Herstellerangaben. Danach wurden die Fluoreszenz-Intensitäten ausgelesen und exportiert. Die Daten wurden mit dem Programm *Partek genomics Suite* Version 6.6 (Partek) analysiert und ausgewertet.

3.2.5 Histologische Methoden

3.2.5.1 Immunhistochemische Färbung von Zelllinien

Zellen wurden in zweifach gekammerten Objektträgern kultiviert, bevor sie in 4 % Paraformaldehyd (PFA) fixiert wurden. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate blockiert. Im Anschluss wurde der in Blockierlösung verdünnte Erstantikörper, , über Nacht auf die Zellen gegeben. Die Präparate wurden mit PBS gewaschen und in einem Cy3 gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS

wurde 1 ml DAPI für 10 Sekunden auf die Zellen gegeben. Die Präparate wurden mit Immumount (Thermo Fisher Scientific) eingedeckt und zur Dokumentation fotografiert.

3.2.5.2 Einbettung von murinen Geweben in Paraffin

Nach Entnahme wurden die Gewebe 12-24 Stunden in 4 % PFA-Lösung fixiert. Die Einbettung wurde durch einen Einbettautomaten bewerkstelligt. Diese Arbeiten am murinen Gewebe wurden in Kooperation mit dem Labor von PD Dr. Ulrich Schüller an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

3.2.5.3 Immunhistochemische Färbungen von Gewebe

3.2.5.3.1 Gewebefärbung mittels Färbeautomaten

Die Gewebefärbungen im Labor von PD Dr. Ulrich Schüller wurden z.T. in einem Färbeautomaten durchgeführt. In dem Gerät wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert und anschließend mit Citratpuffer behandelt. Der Erstantikörper wurde manuell aufgetragen und für 32 Minuten bei 37 °C inkubiert. Das Auftragen des Sekundärantikörpers und die enzymatische Farbentwicklung erfolgten automatisiert. Im Anschluss wurden die Präparate per Hand in Ethanol mit aufsteigender Konzentration (70%, 90%, 100%, 100%, Xylol) für jeweils 10 Minuten entwässert und eingedeckelt.

3.2.5.3.2 Manuelle Färbung

Die Schnitte wurden zu Beginn der Färbung entparaffiniert. Im Anschluss wurde eine 5 % H₂O₂ Lösung in Methanol angesetzt und die Schnitte für 15 bis 20 Minuten darin inkubiert. Danach wurden die Präparate für fünf Minuten in Leitungswasser belassen und dann kurz mit destilliertem Wasser gespült. Nach einer fünfminütigen Inkubation in PBS, wurde etwa 200 µl Blocklösung aufgetragen und für 30 Minuten darauf belassen.

Der Primärantikörper wurde in Blocklösung verdünnt, 200 µl auf die Schnitte aufgetragen und über Nacht bei 4 °C zur Inkubation belassen.

Die Schnitte wurden mit PBS gewaschen, woraufhin 200 µl eines *Super Enhancer* (SE) Reagenz aufgetragen und zur Inkubation belassen wurden. Nach Wiederholen des Waschschrilles wurde für 30 Minuten ein HRP konjugiertes Label-Reagenz aufgetragen. Nach einem weiteren Waschen erfolgte die DAB Entwicklung. Die anschließende Entwässerung erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Danach wurden die Kulturen mit DEPEX[®] eingedeckelt.

3.2.5.4 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die Schnitte wurden entparaffiniert, dann nacheinander für jeweils drei Minuten in 96 %, 70 % Ethanol und anschließend destilliertes Wasser gelegt. Im Anschluss inkubierten die Schnitte in Hämalan, wodurch die Zellkerne blau angefärbt wurden. Durch ein zwanzigminütiges Spülen unter fließendem, kaltem Wasser wurde überschüssiger Farbstoff entfernt. Die Präparate wurden zur Differenzierung kurz in 70 % Ethanol gehalten. Daraufhin erfolgte die Inkubation in Eosinlösung, wonach die Schnitte schnell in 70 % und anschließend in 96 % Ethanol überführt wurden. Die Entwässerung schloss mit jeweils fünfminütiger Inkubation in 100 % Ethanol und Xylol. Im mikroskopischen Bild waren nach dieser Färbung die blaue Färbung des Kerns und die rosa bis rote Färbung des Cytoplasmas zu erkennen.

3.2.6 Bioinformatische und statistische Methoden

3.2.6.1 Analyse von humanen Microarrays

Die bioinformatischen Auswertungen der Microarrays von humanen, primären Neuroblastomen wurden von Mitarbeitern des LS 8, Lehrstuhl für künstliche Intelligenz, der TU Dortmund durchgeführt.

Für die Analysen der Microarray Ergebnisse wurde PAM (**P**rädiktions**a**nalyse von **M**icroarrays) verwendet. PAM ist eine statistische Methode, die 2002 entwickelt (Chu, 2002) wurde. In diesen Arbeiten wurden die PAM-Implementationen in dem Programmpaket „R“ (r-project.org) und in Rapid Miner (Rapid-I, Dortmund) genutzt.

3.2.6.2 Analyse der Expressionsdaten von lncRNAs

Im Labor von Frank Speleman wurden (Zentrum für medizinische Genetik am Universitätsklinikum Ghent, Belgien) aus cDNA Proben qPCRs gegen 1105 lncRNA-Sonden durchgeführt (vergl. Kap. 3.4.7). Für die Analyse nur solche Kontrollpaare zu verwenden, die sich nicht voneinander unterschieden, wurde der *foldchange*, der Quotient, zwischen den beiden Kontrollen gebildet. Bei den Daten handelt es sich um logarithmierte Werte. Das zweite Logarithmengesetz besagt, dass ein Quotient logarithmiert wird, indem vom Logarithmus des Zählers, der Logarithmus des Nenners subtrahiert wird. In der verwendeten Formel wird somit der logarithmische Wert der unbehandelten Kontrolle von dem logarithmierten Wert der Nullkontrolle abgezogen. Ermittelt werden sollten die Kontrollpaare, deren Quotient einen Schwellenwert von 0,5 überschreiten:

$$|ct_{0ctrl} - ct_{nt}| > 0.5$$

Nach diesem Schritt der Datenfilterung wurden die Expressionsdaten der JARID1C siRNA behandelten Zellen mit in die Analyse einbezogen, wozu ebenfalls der *foldchange* berechnet wurde. Aus den Kontrolldaten wurde das arithmetische Mittel gebildet, unter Beachtung des ersten Logarithmengesetzes – ein Logarithmus wird multipliziert, indem die Logarithmen der einzelnen Faktoren addiert werden. Der ermittelte Mittelwert wird vom Ct-Wert der mit siRNA behandelten Probe abgezogen.

$$ct_{si} - 1/2(ct_{0ctrl} + ct_{nt})$$

Die gewonnenen Daten wurden dann mit den Expressionswerten der entsprechenden lncRNAs in humanen HuEx Exonarrays aus Primärtumoren verglichen. Da lncRNAs nicht auf den Chips verzeichnet sind, sich z.T. aber mit bekannten Genen überschneiden, wurden diese Arraysequenzen für die Analyse genutzt (n=323). Um die Arraydaten zu normalisieren wurde das RMA-Verfahren (*Robust Multi-array Average*) angewendet (Irizarry *et al.*, 2003).

Diese Analysen wurden von Johannes Köster am Lehrstuhl für Genominformatik am Universitätsklinikum Essen durchgeführt.

3.2.6.3 Graphische Darstellung und Statistik

Die in dieser Arbeit präsentierten Photographien wurden mit der Software Photoshop Version 6.0 sinnerhaltend bearbeitet. Zur graphischen Darstellung, sowie zur statistischen Evaluierung der in Experimenten gewonnenen Daten wurde die Software GraphPad Prism Version 5.0 genutzt. Verwendete statistische Tests zum Vergleich zweier Gruppen waren bei Normalverteilung der t-Test bzw. bei Nicht-Normalverteilungen der Mann-Whitney U-Test. Zur Berechnung der Genotypverteilung von Mauseuchten wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet. Ab einem p-Wert $< 0,05$ wurden Unterschiede als statistisch signifikant erachtet. Durchgängig wurden folgende Markierungen für unterschiedliche Signifikanzniveaus verwendet: (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Alle aufgeführten Ergebnisse stammen jeweils aus mindestens drei unabhängigen Experimentalreihen mit verschiedener Anzahl von Unterexperimenten. Die exakte Anzahl der durchgeführten Experimente, sowie die Beschreibung der gezeigten Werte (z.B. Mittelwert +/- Standardabweichung) kann aus den Legenden der Abbildungen entnommen werden.

4. Ergebnisse

4.1 Die Rolle der Histondemethylase JARID1C im Neuroblastom

4.1.1 JARID1C in humanen Primärtumoren und Zelllinien

In vorhergehenden Arbeiten wurden Affymetrix Exon Arrays von 113 Patienten mit primären Neuroblastomen angefertigt. Durch auf maschinelle Lernverfahren basierende Prädiktionsmodelle (s. Kap. 3.6.2) wurde die Histondemethylase JARID1C als vielversprechendes Markergen identifiziert (Schowe, 2011).

Anhand von Kaplan-Meier Analysen zeigte sich, dass eine erhöhte Expression von JARID1C zu einer signifikant verschlechterten Überlebenswahrscheinlichkeit führte ($p=1,2 \times 10^{-4}$; Abb. 4.1 A). Da im Neuroblastom eine ungünstige Prognose oft mit der Expression von MYCN korreliert, wurde daraufhin untersucht, ob es eine Korrelation zwischen der MYCN- und der JARID1C Expression in Primärtumoren gibt. Es stellte sich heraus, dass JARID1C unabhängig von MYCN in aggressiven Neuroblastomen exprimiert wurde (Abb. 4.1.B). JARID1C wurde zunächst als Ursache von X-chromosomaler mentaler Retardierung beschrieben (Jensen *et al.*, 2005). Aus diesem Grund analysierten wir die Daten in Hinblick auf geschlechtsbedingte Expressionen. Den Erwartungen entsprechend zeigte sich eine signifikant höhere JARID1C Expression in weiblichen gegenüber männlichen Patienten ($p=3 \times 10^{-16}$; Abb. 4.1 C). Schließlich betrachteten wir die Expression der Histondemethylase in Patienten mit und ohne Rezidiv. JARID1C wurde in signifikant Rezidivpatienten stärker exprimiert ($p=0,04$; Abb. 4.1.D).

Um im Weiteren die Rolle von JARID1C im Neuroblastom zu untersuchen, wurden etablierte Zelllinien verwendet. In Western Blot Analysen zeigte sich, dass JARID1C in allen untersuchten Neuroblastom Zelllinien exprimiert wurde (Abb. 4.2).

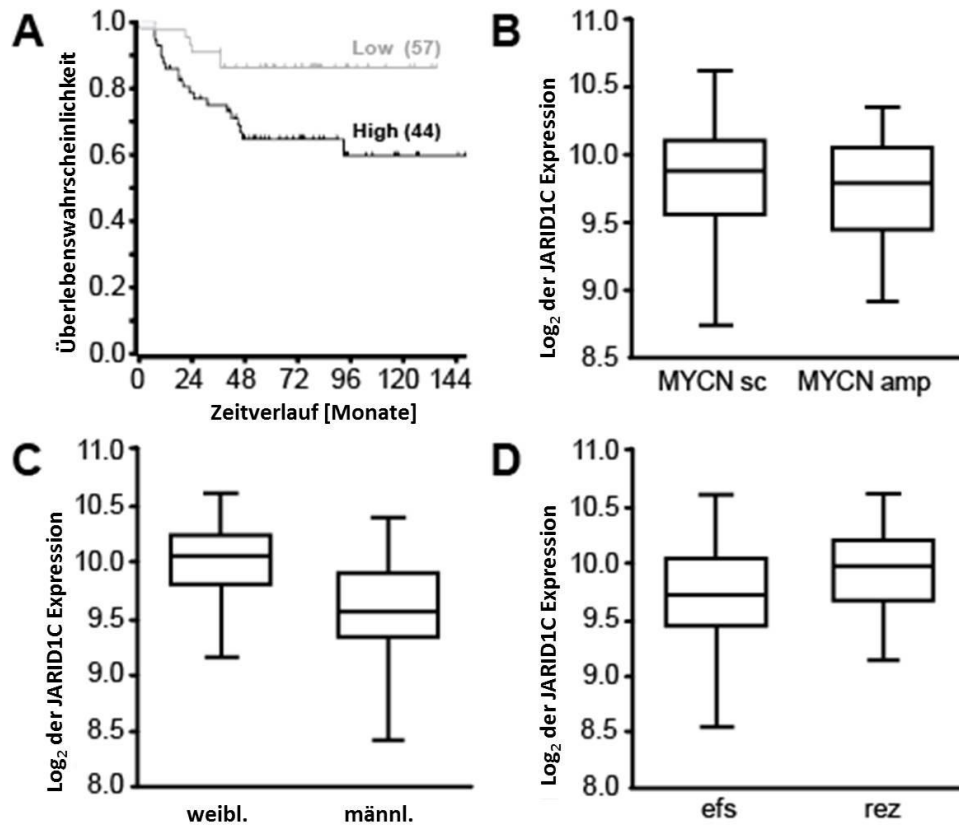


Abbildung 4.1 – JARID1C Expression im primären Neuroblastom: Affymetrix Exon Array Analysen zeigten, dass Patienten mit hoher JARID1C Expression eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit aufwiesen ($p=1,2 \times 10^{-4}$) (A), wobei die JARID1C Expression unabhängig von MYCN war (B). JARID1C wurde in weiblichen Patienten stärker exprimiert als in männlichen ($p=3 \times 10^{-16}$) (C) und wurde in Patienten, die im Verlauf ein Rezidiv ausbildeten (rez.), erhöht exprimiert ($p=0,04$) (D).

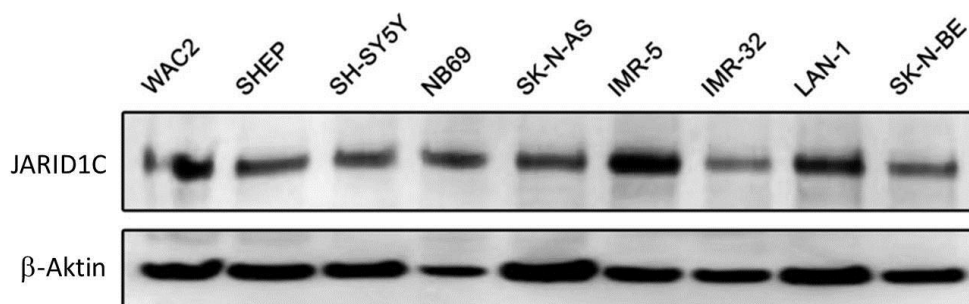


Abbildung 4.2 – Expression von JARID1C in Neuroblastomzellen: Western Blot Analyse von verschiedenen Neuroblastomzelllinien. JARID1C wurde in allen untersuchten Zelllinien exprimiert.

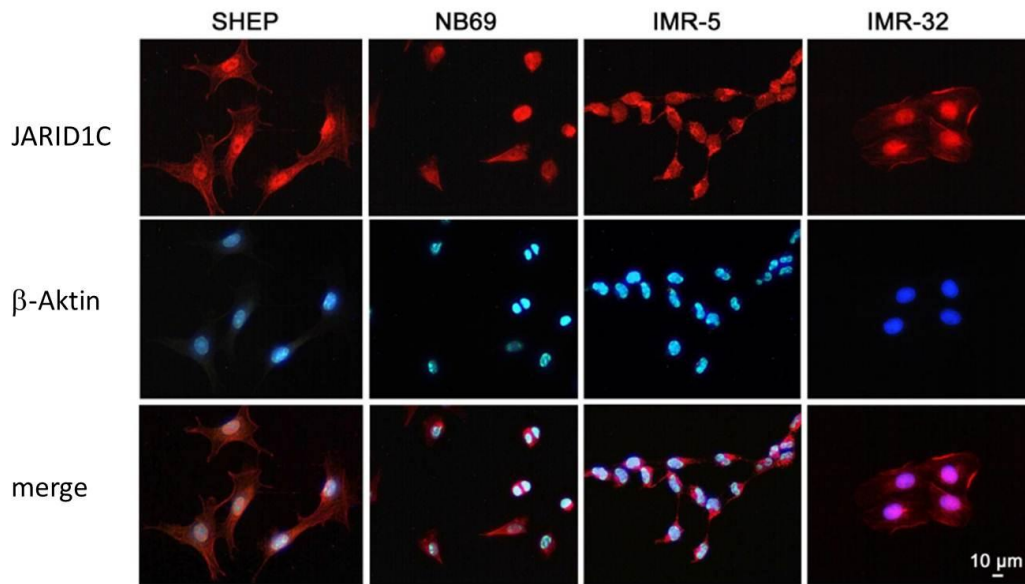


Abbildung 4.3 – Lokalisation von JARID1C in vier Neuroblastomzelllinien: In SHEP Zellen fand sich die JARID1C Lokalisation vor allem im Nukleus, in NB 69 in der gesamten Zelle. In den MYCN amplifizierten Zelllinien IMR5 und IMR 32 fand sich die JARID1C Lokalisation im Zytoplasma bzw. im Zellkern. Als Kontrolle für die Zellkernlokalisation wurde eine DAPI Färbung durchgeführt.

Für die weiteren Analysen konzentrierten wir uns zunächst auf den Nachweis des JARID1C Proteins in vier Neuroblastomzelllinien durch Immunfluoreszenz. Es wurden SHEP und NB 69 Zellen als Beispiele für Zellen mit *single copy* MYCN und IMR5 und IMR32 als Beispiele für MYCN amplifizierte Zelllinien ausgewählt. Es zeigte sich, dass in SHEP Zellen vor allem im Zellkern eine prominente Anreicherung des Proteins zu finden war (Abb. 4.3). In IMR5 Zellen hingegen zeigte sich vor allem eine Färbung im Zytoplasma (Abb. 4.3). In NB 69 Zellen war die gesamte Zelle gefärbt, während in IMR 32 ein Signal in den Zellkernen detektiert wurde. Somit ist die Lokalisation des Proteins in der Zelle nicht mit dem MYCN Status korreliert, sondern Zelllinien spezifisch.

4.1.2 Effekte siRNA vermittelter Inhibition von JARID1C in vitro

SHEP und IMR5 Zellen wurden für 24 Stunden mit siRNA gegen JARID1C behandelt und 24 bzw. 48 Stunden nach Mediumwechsel analysiert. Die Effizienz des *knock-downs* wurde auf mRNA Ebene durch qPCR bestimmt. Es zeigte sich, dass es in SHEP Zellen bereits nach 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der JARID1C mRNA Level kam, während in IMR5 Zellen erst nach 48 Stunden ein signifikanter Abfall zu verzeichnen war (Abb. 4.4 A). Western Blot Analysen bestätigten die verzögerte Reaktion der IMR5 Zellen im Gegensatz zu SHEP Zellen. Nach 48 Stunden war in beiden Zelllinien ein signifikanter *knock-down* des JARID1C Proteins zu erkennen (Abb. 4.4 B).

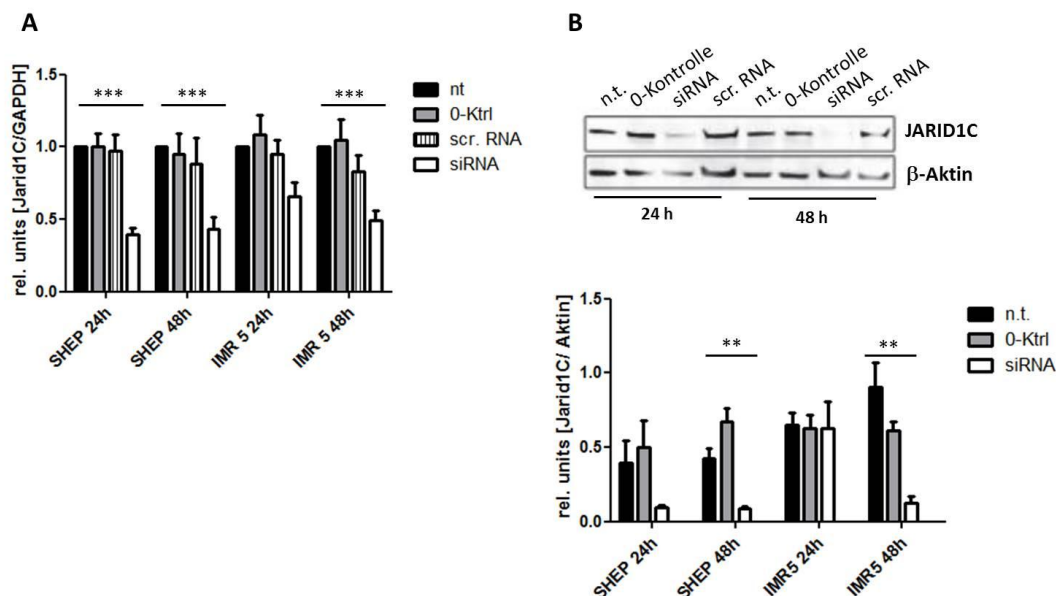


Abbildung 4.4 – Auswertung der mRNA- und Proteinlevel von JARID1C nach siRNA Transfektion: Die durch qPCR ermittelten mRNA Level von JARID1C waren nach siRNA Transfektion verringert (A). In SHEP Zellen war dieser Effekt schon nach 24 Stunden signifikant ($p < 0,0001$). In IMR5 Zellen stellte sich erst nach 48 Stunden eine signifikante Reduktion der mRNA Level ein ($p < 0,0001$). Auf Proteinebene (B) zeigt sich in der graphischen Darstellung, dass die Reduktion der JARID1C Proteinlevel in beiden Zelllinien nach 48 Stunden signifikant wurde (SHEP $p = 0,0023$, IMR5 $p = 0,0042$). Die Abbildung der Membran zeigt repräsentativ für alle Experimente einen Western Blot von SHEP Zellen. n.t. = unbehandelt (*non-treated*), 0-Ktrl = nur mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen, scr RNA = *scrambled* RNA als Kontrolle. Die Graphen zeigen Mittelwerte aus $n=3$ (qPCR) bzw. $n=4$ (Western Blot) Experimenten. Eingezeichnet ist die Mittelabweichung.

Betrachtet man die siRNA transfizierten Zellen, so sind morphologische Veränderungen auffällig. Im Gegensatz zu den Kontrollen kam es bei SHEP Zellen zu einer starken Abkugelung der Zellen, ein Hinweis auf Apoptose, sowie zu verminderter Konfluenz. Auch in IMR5 Zellen deutete die Zellmorphologie auf Apoptose hin (Abb. 4.5 A). Um zu bestätigen, dass sich der Anteil apoptotischer Zellen durch siRNA Transfektion verändert, wurden FACS und ELISA Analysen durchgeführt. In beiden Analysen zeigte sich ein signifikanter Anstieg an apoptotischen Zellen nach JARID1C *knock-down* (Abb. 4.5 B, C).

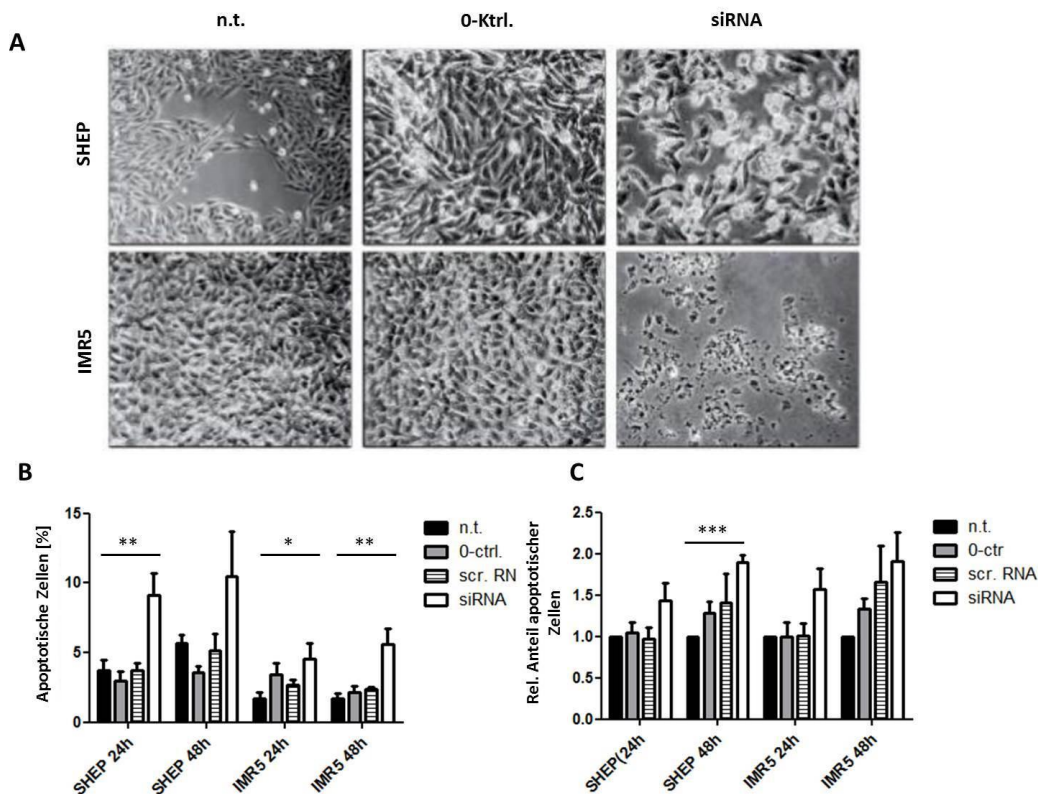


Abbildung 4.5 – JARID1C siRNA vermittelter Anstieg von Apoptose in SHEP und IMR5 Zellen:

Morphologisch erkennt man eine Abkugelung der SHEP Zellen nach JARID1C siRNA Transfektion, die IMR5 Zellen waren nach 24 Stunden bereits degradiert (A). FACS Analysen bestätigten einen signifikanten Anstieg der Fraktion apoptotischer Zellen (B) (In SHEP nach 24h $p=0,0078$, in IMR5 nach 24h $p=0,0223$, in IMR5 nach 48h $p=0,0025$). ELISA basierte Analysen bestätigten einen Anstieg an Apoptose (C) (In SHEP nach 48h $p=0,0001$). Die Graphen zeigen Mittelwerte aus 7 (FACS) bzw. 3 (ELISA) Experimenten, sowie die Mittelabweichung.

Im Folgenden testeten wir die Viabilität sowie Proliferation der Zellen nach siRNA Behandlung. Der morphologische Eindruck, dass transfizierte Zellen im Gegensatz zu Kontrollen eine verminderte Konfluenz zeigten (Abb. 4.5), wurde durch

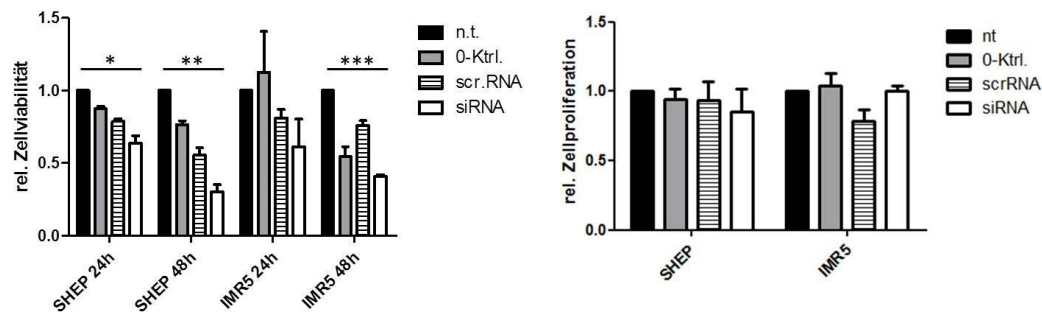


Abbildung 4.6 – Darstellung der Zellviabilität und Proliferation nach siRNA vermittelte JARID1C Runterregulation: In SHEP Zellen wurde die Zellviabilität 24 und 48 Stunden nach JARID1C siRNA Transfektion signifikant reduziert (24 h $p=0,0185$; 48h $p=0,0051$). In IMR5 Zellen zeigte sich erst nach 48 Stunden eine signifikante Reduktion ($p=0,0004$) (A). Die Zellproliferation blieb durch den JARID1C *knock-down* unverändert (B). Die Graphen zeigen Mittelwerte aus $n=3$ Experimenten. Die Mittelabweichung ist eingezeichnet.

Zellviabilitätsmessung bestätigt. Nach JARID1C siRNA Behandlung für 24 bzw. 48 Stunden kam es in SHEP und IMR5 Zellen zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (Abb. 4.6.A). Allerdings konnten wir im BrdU Elisa keine Verringerung der Proliferationsraten detektieren (Abb. 4.6.B).

JARID1C ist eine Histondemethylase, welche das Histon H3 am Lysin 4 demethyliert (Iwase et al., 2007). Um zu prüfen, ob nach siRNA vermittelter JARID1C Inhibition die H3K4 Methylierung in den Neuroblastomzellen SHEP und IMR5 verändert war wurde mittels Western Blot Analysen die Tri-, Di- oder Monomethylierung am Lysin 4 des Histon 3 (H3K4) untersucht (Abb. 4.7).

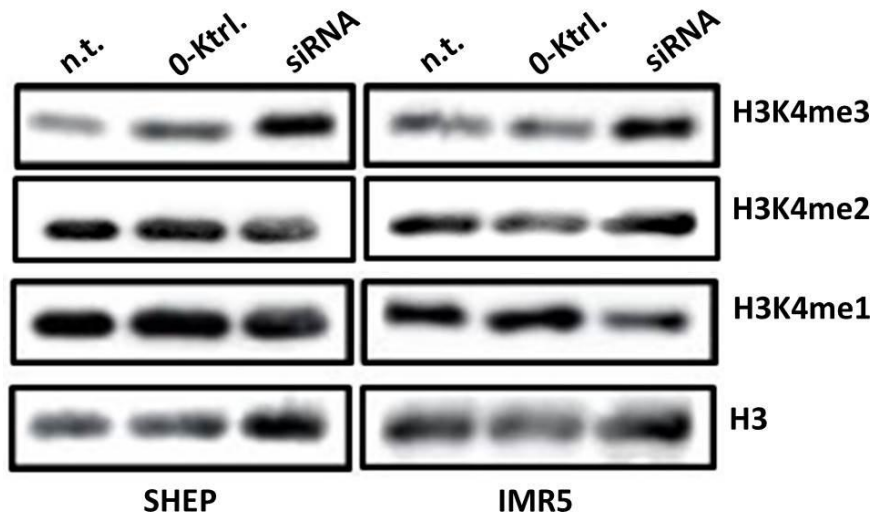


Abbildung 4.7 – Qualitative Auswertung der H3K4 Methylierung in SHEP und IMR5 Zellen nach siRNA vermittelter Reduktion von JARID1C: In beiden Zelllinien war zu erkennen, dass die Trimethylierung des Lysin 4 am Histon 3 (H3K4me3) Level nach siRNA Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen erhöht waren. Die Dimethylierung von H3K4 (H3K4me2) blieb unverändert. Die Monomethylierung (H3K4me1) war erkennbar verringert. N.t. – unbehandelte Zellen; 0-Ktrl – mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen; siRNA – mit JARID1C siRNA behandelte Zellen

4.1.3 Expression von Zielgenen unter siRNA vermittelter JARID1C Inhibition

Wir untersuchten die Expressionsprofile nach siRNA vermitteltem JARID1C *knock-down* in Neuroblastomzelllinien. Jedoch konnten wir keine Zielproteine identifizieren, deren mRNA-Spiegel eine signifikante Korrelation oder Anti-Korrelation mit dem Status von JARID1C aufwiesen. Daher wurden die Untersuchungen auf nicht-kodierende RNAs ausgedehnt. Ähnlich wie microRNAs können *long non-coding* RNAs (lncRNAs), obwohl sie nicht für Proteine kodierend sind, einen großen Einfluss auf die Genexpression haben (An und Song, 2011). Auch in verschiedenen Krebsarten, wie Lungenkrebs, Brustkrebs oder dem Osteosarkom spielen sie eine wichtige Rolle (Ji *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2014). Wir konzentrierten uns zunächst auf die lncRNA Malat 1 und konnten zeigen, dass die Expression in MYCN amplifizierten Zelllinien geringer war als in *single copy* Zellen (Abb. 4.8 A). Nach siRNA vermitteltem *knock-down* von JARID1C zeigte sich eine Erhöhung der Malat1 Expression in SHEP und IMR5 Zellen ($p=0,035$) (Abb. 4.8.B).

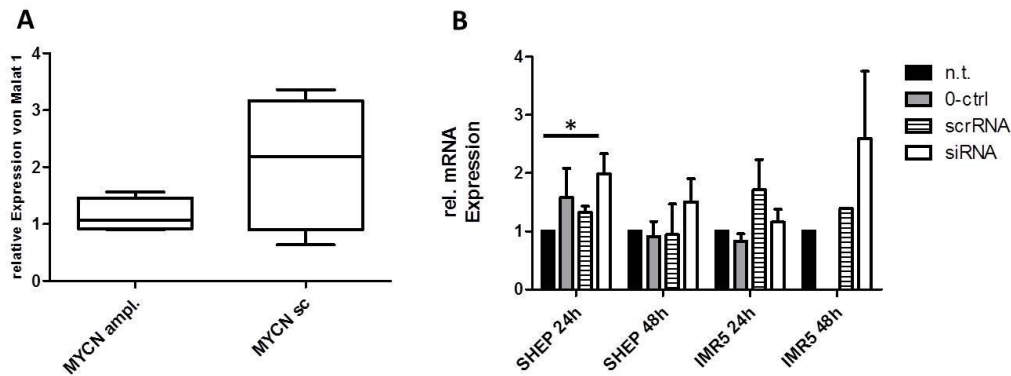


Abbildung 4.8 – Darstellung der Malat1 Expression in Neuroblastomzelllinien: Die lncRNA Malat1 wurde in MYCN *single copy* Zelllinien stärker exprimiert als in MYCN amplifizierten Zelllinien (**A**). Ein siRNA vermittelter *knock-down* von JARID1C führte zu einem Anstieg der Malat1 Expression in SHEP (24 h $p=0,035$) und IMR5 Zellen (**B**). N.t. – unbehandelte Zellen; 0-Ktrl. – mit Transfektionsreagenz behandelte Zellen; scrRNA – mit *scrambled* RNA und siRNA – mit siRNA behandelte Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Mittelabweichungen aus $n=3$ Experimenten.

Um weitere Möglichkeiten der JARID1C Wirkung auf lncRNAs in Neuroblastomzellen zu beschreiben, wurde ein qPCR Profiling von unbehandelten (n.t.), mit Transfektionsreagenz behandelten (0-Ktrl.) und siRNA behandelten (siRNA) SHEP Zellen angefertigt und die Ergebnisse von Johannes Köster am Lehrstuhl für Genominformatik am Universitätsklinikum Essen analysiert. Es zeigte sich, dass durch siRNA vermittelte Herunterregulation von JARID1C in SHEP Neuroblastomzellen eine Reihe von lncRNAs in ihrer Expression beeinflusst wurde. Unter den am stärksten regulierten lncRNAs fanden sich u.a. NEAT1, Xist und Malat1.

Bei dem anschließenden Vergleich der qPCR Daten und der Affymetrix Exon Array Daten von Primärtumoren zeigte sich jedoch kein globaler Zusammenhang zwischen JARID1C und lncRNA Expression, sodass dieser Teilbereich der Analysen nicht weiter verfolgt wurde.

4.1.4 Effekte der chemischen JARID1C Inhibition durch Pbit

2013 wurde von Sayegh et al. mit Pbit (N-Phenyl-Benzothiazolinon) ein JARID1B Inhibitor beschrieben, der in Brustkrebszellen auch die JARID1C Funktion inhibiert (Sayegh *et al.*, 2013). Um zu testen, ob eine chemische Inhibition der Histondemethylase einen vergleichbaren Effekt hat wie die molekulare Inhibition, behandelten wir die Zellen für jeweils 72 Stunden mit Pbit.

Diese Behandlung der Zellen mit Pbit führte zu morphologischen Veränderungen sowie einem Anstieg der Zahl apoptotischer Zellen. Sowohl in SHEP Zellen, als auch in IMR5 Zellen ließ sich nach Pbit Behandlung eine Abkugelung der Zellen beobachten (Abb. 4.8 A). Dieses apoptotische Merkmal findet Bestätigung in FACS Analysen. Auch hier zeigte sich nach Pbit Behandlung ein in SHEP Zellen signifikanter Anstieg der subG1 Phase ($p=0,012$), in IMR5 Zellen ließ sich ein Trend verzeichnen (Abb. 4.9 B).

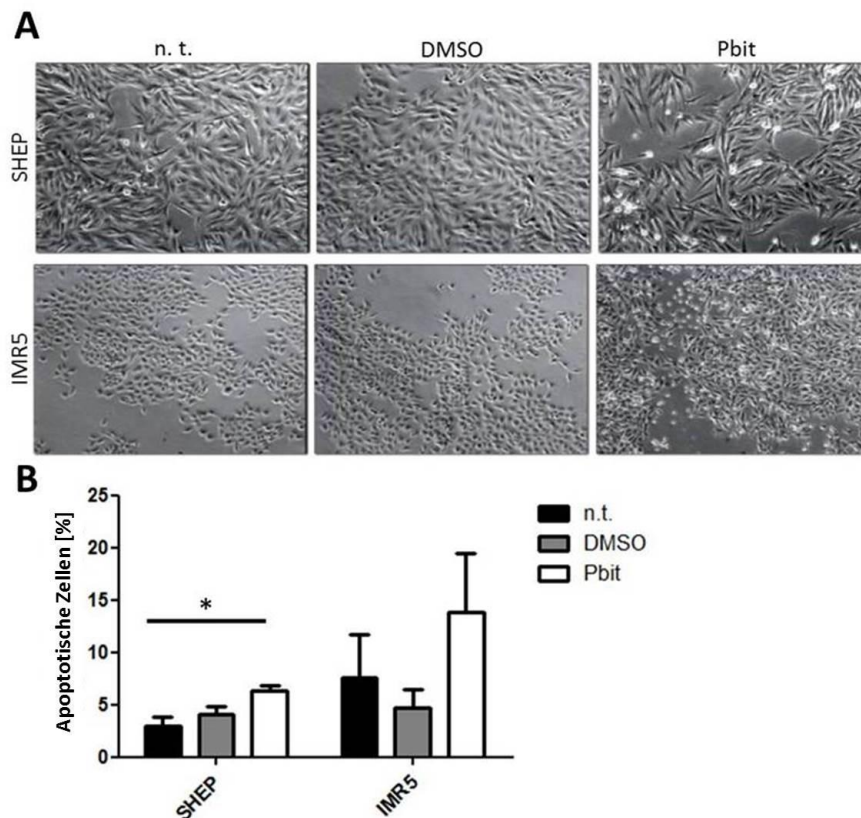


Abbildung 4.9 – Phänotyp und Anteil apoptotischer Zellen von SHEP und IMR5 Zellen nach JARID1C Inhibition durch Pbit: Die Zellen zeigten nach Pbit Behandlung einen abgekugelten Phänotyp, sowie verringerte Konfluenz (A). FACS Analysen zeigten gesteigerte Apoptoseraten ($p=0,012$) n.t. – unbehandelte (*non-treated*) Zellen. Der Graph zeigt Mittelwerte aus $n=3$ Experimenten, sowie die Mittelabweichung.

Da Pbit die Funktionsweise von JARID1C inhibiert, sollte sich im Expressionslevel des JARID1C Proteins nichts ändern, während wir eine Verschiebung der H3K4 Methylierung beobachten sollten. Wir konnten jedoch keine Verschiebung der Methylierungsstatus feststellen (Abb. 4.10).

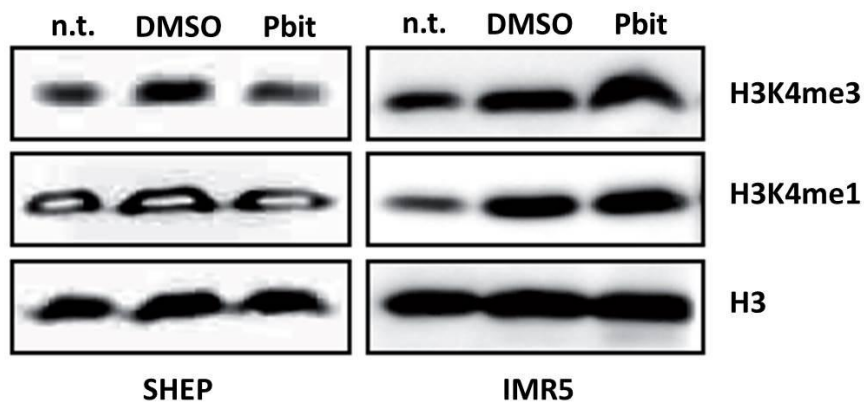


Abbildung 4.10 – Western Blot Analysen zum Methylierungsstatus in SHEP und IMR5 Zellen nach Pbit Behandlung: Der Methylierungsstatus an H3K4 ändert sich nach Pbit Behandlung nicht. N.t. = unbehandelt (*non treated*)

4.2 Modellierung MYCN getriebener Mausmodelle für pädiatrische Tumorerkrankungen

Um MYCN getriebene, pädiatrische Tumormodelle in der Maus zu entwickeln, nutzten wir eine Cre Rekombinase vermittelte konditionale Überexpression von MYCN. Mit Hilfe von DBHi-Cre;Lsl-MYCN Mäusen konnten bereits MYCN getriebene Neuroblastome generiert und untersucht werden (Althoff *et al.*, 2014). Die Lsl-MYCN Mäuse, durch deren Verpaarung mit DBHi-Cre bereits Neuroblastome induziert werden konnten (Althoff *et al.*, 2014) (vergl. Kap. 1.3.1.2), wurden mit Cre-Stämmen verpaart, die eine Expression von MYCN in Zellen des sich entwickelnden Nervensystems bewirken sollten.

4.2.1 Medulloblastomentwicklung in Lsl-SmoM2;GFAP-Cre Mäusen

Zur Etablierung der Methode verpaarten wir GFAP-Cre und SmoM2 Mäuse. Eine Chi-Quadrat Analyse der Genotypen der Jungtiere wurde durchgeführt. In die Analyse gingen 35 Tiere ein, wovon 14 Tiere doppelt-transgen waren, was bei einem p-Wert von 0,23 darauf hinweist, dass der Genotyp nicht embryonal letal ist (Abb. 4.11).



Abbildung 4.11 – Verteilung der Genotypen der Nachkommen der SmoM2;GFAP-Cre Linie: Die Analyse des Chi-Quadrat-Test, gab einen P-Wert von 0,23 an. In die Analyse gingen 35 Tiere ein (tg/tg 14; tg/wt 21).

Die aus dieser Verpaarung hervorgehenden doppelt-transgenen Mäusewelpen entwickelten massive Medulloblastome und starben innerhalb von 18 Tagen *post natum* (Abb. 4.12). Histologische Untersuchungen, durchgeführt von Ulrich Schüller in München, zeigten, dass die Tiere Hydrocephali und Medulloblastome entwickeln (Abb. 4.13).

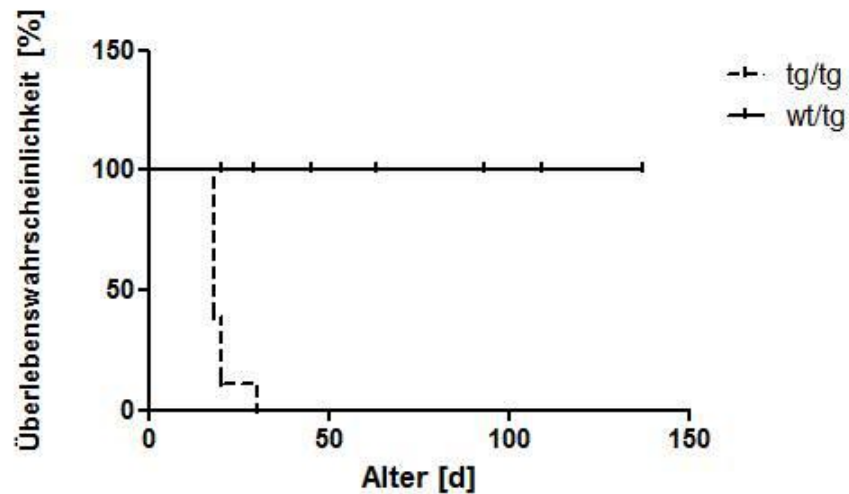


Abbildung 4.12 – Kaplan-Meier Analysen von SmoM2;GFAP-Cre transgenen Tieren: Alle doppelt-transgenen (tg/tg; n=14) Tiere entwickeln im Gegensatz zu den Kontrollen (wt/tg; n=21) einen Hirntumor ($p < 0,0001$).

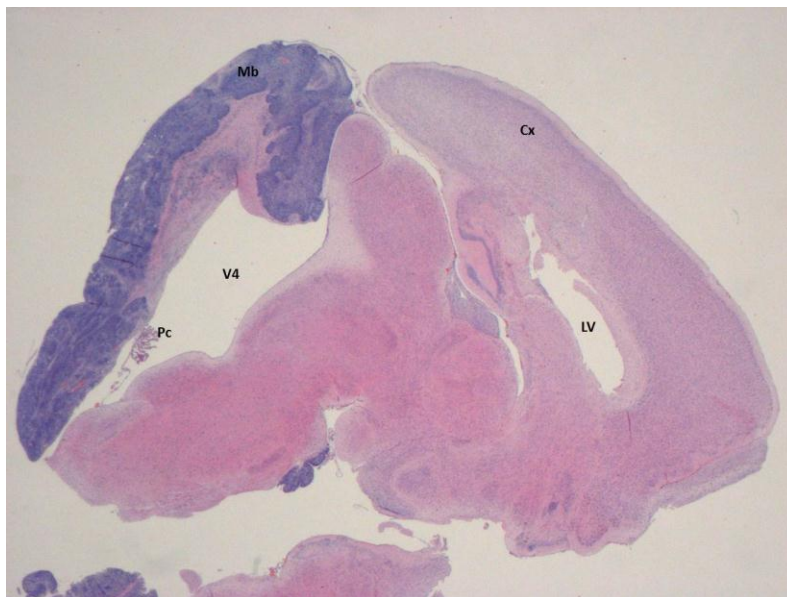


Abbildung 4.13 – Histologische Untersuchung eines Hirntumors aus einer transgenen Lsl-SmoM2;GFAP-CreMaus: HE Färbung – Sagittalschnitt. Mb – Medulloblastom; Pc – *Plexus choroideus*, Cx – Cortex, V4 – vierter Ventrikel, LV – Seitenventrikel

4.2.2 MYCN Expression in Lsl-MYCN;Nestin-Cre Mäusen

Ein weiterer vielversprechender Ansatz für die Untersuchung embryonaler Hirntumore in transgenen Mäusen ist die spezifische Überexpression eines Onkogens wie MYCN in Nestin-positiven Zellen. Nestin kann ab dem siebten Embryonaltag (E 7,5) detektiert werden und ist ab E 10 im Neuralrohr aktiv (Dahlstrand *et al.*, 1995). Im Cerebellum lässt sich Nestin zwischen E 15,5 und der Geburt nachweisen (Dahlstrand *et al.*, 1995). Wir verpaarten demnach auch ein Nestin-Cre Tier mit der Lsl-MYCN Maus, um eine MYCN Expression in Nestin positiven Zellen zu einem für die Entstehung embryonaler Tumoren entscheidenden Zeitpunkt herbeizuführen.



Abbildung 4.14 – Verteilung der Genotypen der Nachkommen der Lsl-MYCN;Nestin-Cre Verpaarung: Die Analyse auf embryonale Letalität ergab einen p-Wert von 0,47, was darauf hindeutet, dass der Genotyp nicht embryonal letal ist. In diese Analyse gingen 23 Tiere ein.

Eine Untersuchung auf embryonale Letalität zeigte auch hier, dass die Verpaarung nicht embryonal letal ist; die Jungtiere wurden im erwarteten Verhältnis nach Mendel (1 wt/wt : 2 wt/tg : 1 tg/tg) geboren (Abb. 4.14).

Um die Organe der Maus auf das Herausschneiden der Stopp-Sequenz zu untersuchen (vergl. Kap. 3.2.2.2), wurde eine „flox-out“ PCR durchgeführt. Erwartet wurde eine Bande der Größe von 2241 bp bzw. 704 bp, in Abhängigkeit vom Herausschneiden der Stopp-Sequenz (Abb.4.15). In der PCR deutlich erkennbar war eine 704 bp große Bande in der DNA des Gehirns, sowie in DNA der Niere, der Lunge und der Haut (Abb. 4.15). Die DNA der Leber zeigte lediglich eine Bande von 2241 bp (Abb. 4.15).

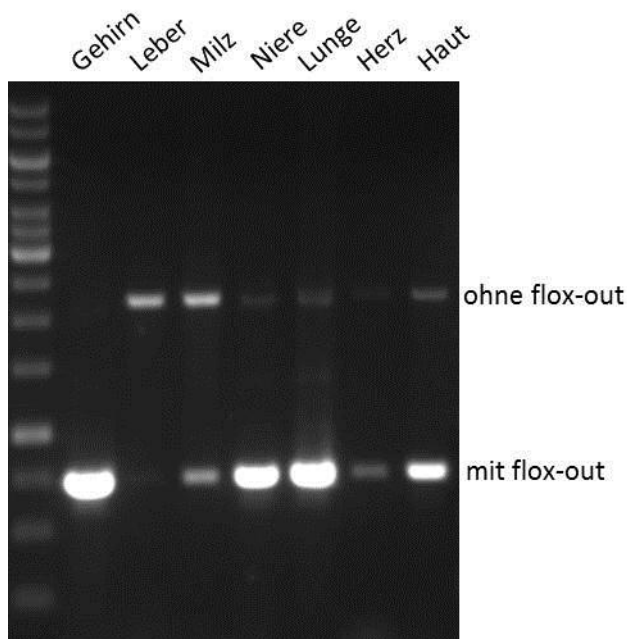


Abbildung 4.15 – PCR Analyse von Organen der Lsl-MYCN;Nestin-Cre Maus: In der „flox-out“ PCR zeigten sich kürzere Amplikons in Gehirn, Niere und Lunge, die auf Cre-Aktivität in der entsprechenden Geweben hinweisen. In der Leber war die Cre-Rekombinase nicht aktiv, das große Amplikon lag vor.

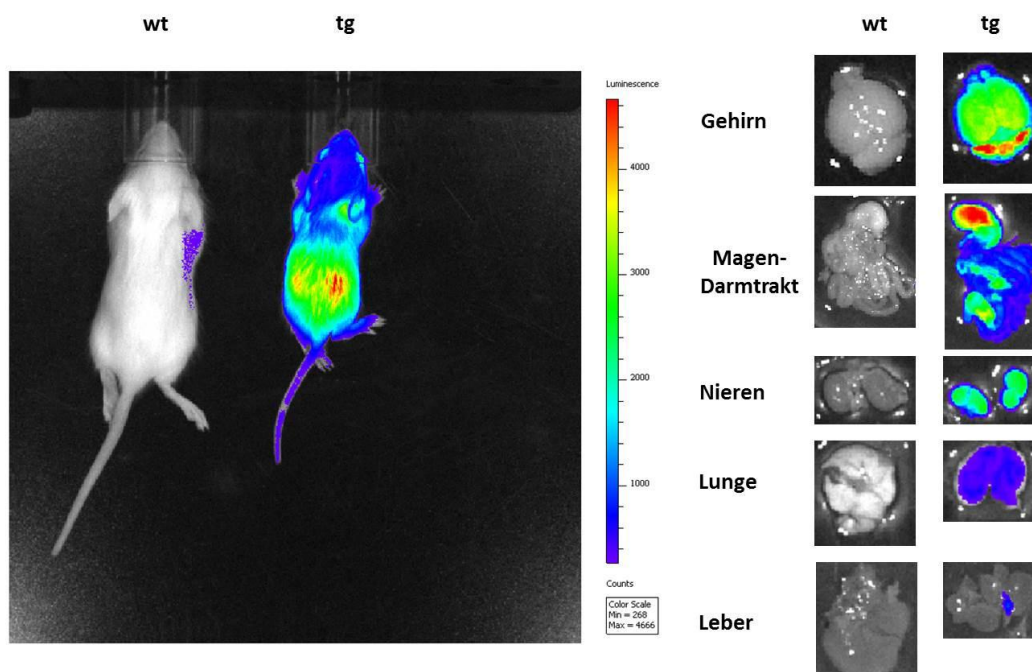


Abbildung 4.16 – Luciferase *Imaging* von Lsl-MYCN;Nestin-Cre Mäusen: Repräsentatives Beispiel für Biolumineszenz Bildgebung von Lsl-MYCN;Nestin-Cre Mäusen. Sie zeigt deutliche Signale in Gehirn, Magen-Darmtrakt, Nieren und Lunge von transgenen Tieren.

Sechs der Lsl-MYCN-Nestin-Cre Tiere entwickelten *Hydrocephali* und *Hyperplasien* im Bereich des Kleinhirns, die aber mit zunehmendem Alter verschwanden. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 250 Tagen beobachtet, jedoch entwickelte keines der Tiere einen Tumor. Allerdings hatten viele Jungtiere Probleme mit dem Verdauungstrakt, unter anderem *Ileus* (n=3), aufgetriebener Magendarmtrakt (n=1) oder Analprolaps (n=4). Um herauszufinden, ob dieser Phänotyp mit einer MYCN Expression in diesen Organen im Zusammenhang steht, nutzten wir die Methode des *in-vivo Imagings*. Mit Hilfe der Biolumineszenz-Bildgebung konnten wir zunächst ein starkes Signal im transgenen Tier darstellen (Abb.4.16). Bei der Untersuchung einzelner Organe der Tiere, stellte sich heraus, dass doppelt-transgene Tiere starke Luciferasesignale in Magendarmtrakt, sowie der Niere und der Lunge aufweisen (Abb.4.16). Es war außerdem sehr auffällig, dass doppelt-transgene Tiere oft kleiner waren als ihre wildtypischen Wurfgeschwister (Abb. 4.16). Diese Beobachtung konnte in allen erhaltenen Würfen gemacht werden (n=8).

4.2.3 Initiale Charakterisierung von Lsl-MYCN;Math-1-Cre transgenen Tieren

Math-1 wird ab Embryonaltag 10 im Cerebellum exprimiert, wobei die Expression vor allem in der externen granulären Schicht (EGL) zu finden ist. Die Expression endet im Kleinhirn am siebten postnatalen Tag (Ben-Arie *et al.*, 1996; Schuller *et al.*, 2008). Da die Expression von Math-1 dem Fenster der Entstehung embryonaler und frühkindlicher Tumore entspricht, nutzten wir Math-1-Cre Tiere, um MYCN in den Zielzellen zu exprimieren. Wir erhielten die nach Mendel erwartete Verteilung an Nachkommen, sodass keine embryonale Letalität vorliegt (Abb. 4.17). Allerdings zeigten diese Tiere keine Tumorentstehung oder sonstigen Veränderungen oder Auffälligkeiten.



Abbildung 4.17 – Verteilung der Genotypen der Nachkommen der Lsl-MYCN;Math-1-Cre Verpaarung:

Die Analyse auf embryonale Letalität von 46 Tieren ergab einen P-Wert von 0,39. Die Verpaarung war somit nicht embryonal letal.

4.3 MYCN getriebene Tumorentstehung im Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mausmodell

4.3.1 Allelverteilung und Genotypen der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäuse

Verpaarungen zur Generierung Lsl-MYCN;GFAP-Cre wurden über 35 Monate durchgeführt. In dieser Zeit wurden sowohl heterozygote Tiere miteinander verpaart, als auch heterozygote mit homozygoten. Um eine Aussage über embryonale Letalität in Abhängigkeit vom Genotyp zu erhalten, wurden die Genotypen der Nachkommen durch den Chi-Quadrattest verglichen. Bei einer heterozygoten Verpaarung erwarteten wir 25% wildtypische Nachkommen, 50% wt/tg und 25% doppelt-transgene Jungtiere, während bei einer homozygot-heterozygoten Verpaarung 50% der Tiere doppelt-transgen und 50% tg/wt erwartet wurden. Betrachtet man die Verteilung, so erkennt man, dass diese Erwartungen erfüllt wurden (Abb. 4.18). Alle Nachkommen der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Verpaarung waren lebensfähig.

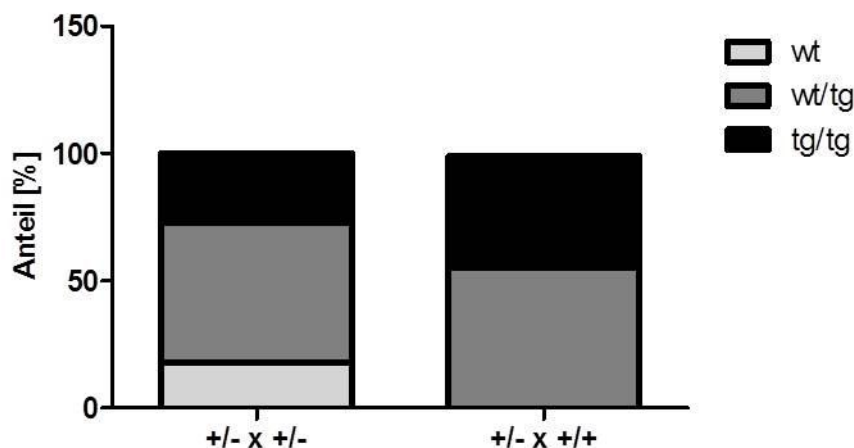


Abbildung 4.18 – Verteilung der Genotypen der Nachkommen der Lsl-NYMYC;GFAP-Cre Verpaarung: Die Analyse auf embryonale Letalität, in die 214 Tiere eingingen, zeigt bei einem p-Wert von 0,12, dass der Genotyp nicht embryonal letal ist.

Zur Bestimmung der Effizienz der Cre Aktivität in verschiedenen Organen wurde wiederum ein *flox-out* PCR durchgeführt (vergl. Kap. 3.2.2.2). Bei Cre-Rekombinase Aktivität im untersuchten Gewebe wurde eine DNA-Bande von 704 bp, ohne Cre Aktivität eine Bande von 2241 bp erwartet. Die Ergebnisse zeigten deutlich ein 704 bp große Bande in Pankreas- und Hirntumoren, des Weiteren in Pankreas, Cortex und Cerebellum. Leber, Muskel und Haut wiesen sowohl eine 704 bp als auch eine 2241 bp große Bande auf. Milz, Niere und Herz zeigten keinen *flox-out* der Stopp-Sequenz (Abb. 4.19).

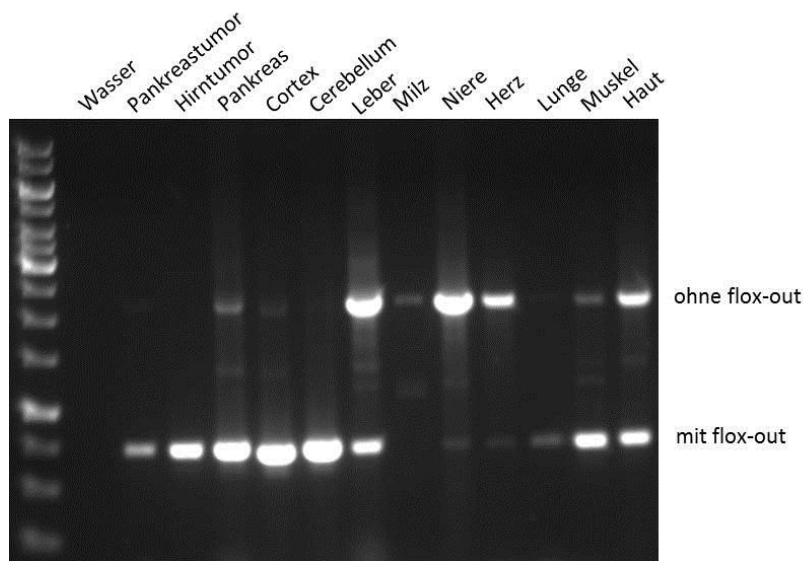


Abbildung 4.19 – PCR Analysen von Geweben einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre doppelt-transgenen Maus: In Geweben wie Pankreas- und Hirntumor wurde die Cre Rekombinase aktiv und die Stopp-Sequenz heraus geschnitten, so dass das Amplikon eine Größe von 704 bp aufweist. Im Leber und Haut zeigte sich ein unvollständiger *flox-out*, es waren sowohl die Bande bei 704 bp als auch eine bei 2241 bp vorhanden. Niere und Herz zeigten mit einer Bande von 2241 bp keinen *flox-out*.

4.3.2 Tumorinzidenz und –lokalisation

Für Kaplan-Meier-Analysen wurde das tumor-freie Überleben der doppelt-transgenen Tiere (n=54) im Vergleich zur Beobachtungskohorte aufgezeichnet (n=67). Während alle Kontrolltiere im Beobachtungszeitraum von 1005 Tagen tumorfrei überlebten, wurde bei den doppelt-transgenen Tieren eine Tumorinzidenz von 60% festgestellt ($p < 0,0001$). Die Mäuse wurden ab dem siebten Monat durch oft aufgetriebene Abdomina bei sonstigem Gewichtsverlust, durch fettiges, struppiges Fell, buckelige Körperhaltung und gestelzten Gang auffällig. Bei der Eröffnung des Bauchraums war oft als erstes eine sehr große, volle Gallenblase zu erkennen. Dorsal der Leber gelegen, angelagert an Milz und Duodenum fand

sich bei 47 % der Tiere ein Tumor im Pankreasgewebe ($p < 0,0001$; Abb. 4.20, 4.21 A). Die Pankreastumore hatten meist sehr kleine Volumina. Im Durchschnitt wiesen sie einem Durchmesser von 5,1 mm auf, wobei einzelne Tumore Durchmesser von 12 mm oder 19 mm aufwiesen. Bei 22 % der doppelt-transgenen Tiere konnte ein Tumor an der Hypophyse festgestellt werden. 9 % der Tiere entwickelten sowohl einen Pankreas- als auch einen Hypophysentumor ($p = 0,027$; Abb. 4.20, 4.21A-C).

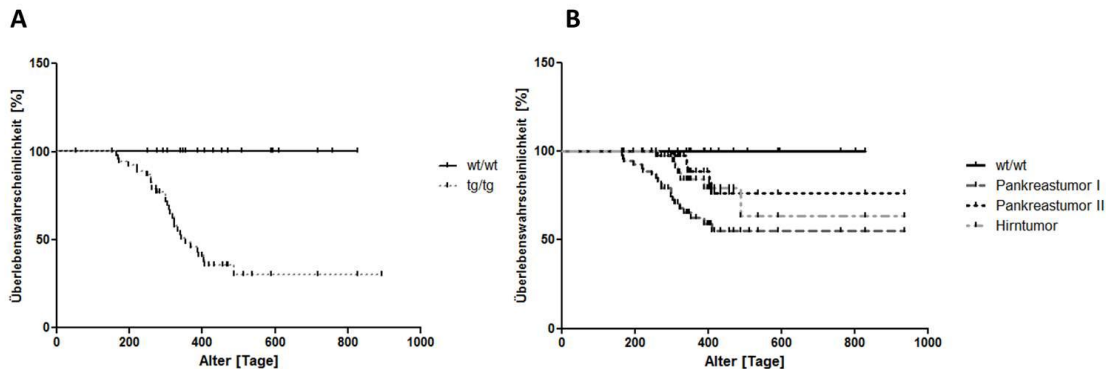


Abbildung 4.20 – Kaplan-Meier-Analyse der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäuse: Im Gegensatz zu den Kontrollen (wt/wt) entwickelten die transgenen Tiere Tumore. Insgesamt sahen wir eine Tumorzinzidenz von 59 % ($p < 0,0001$) (A). Genauer aufgeschlüsselt kam es zu Entwicklung singulärer Pankreaskarzinome (Pankreastumor I; $p < 0,0001$), singulärer Hirntumore (Hirntumor; $p = 0,006$) oder einer Kombination aus beiden (Pankreastumor II; $p = 0,0273$) (B). Es wurden insgesamt 67 Kontrolltiere und 54 doppelt-transgene Tiere in die Analyse einbezogen.

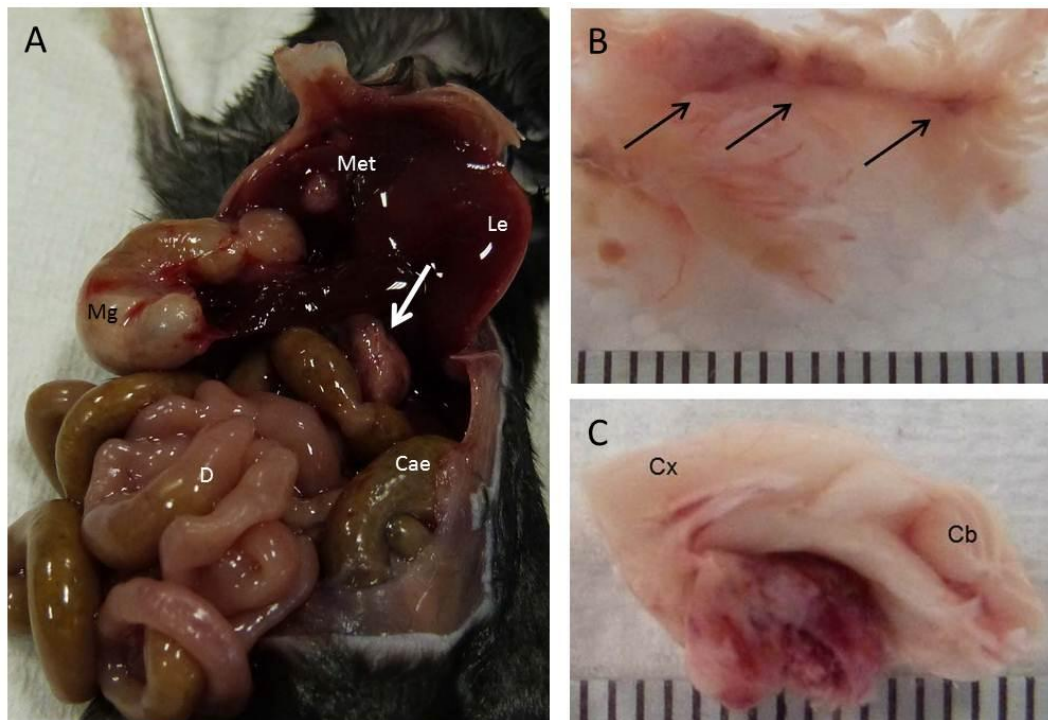


Abbildung 4.21 – Lokalisation und Anatomie der Tumore in Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäusen: In doppelt-transgenen Mäusen fand sich dorsal zum Magen (Mg) gelegen, an diesen und die Milz angelagert ein Tumor (A - Pfeil), welcher dem Pankreasgewebe entsprang (B). In vier dieser Mäuse fanden sich Lebermetastasen (A). 31 % der Tiere entwickelten Hirntumore (C). Diese Tumore befanden sich an der Schädelbasis, in der *Hypophyse*. Met – Metastase, Mg – Magen, Cae – *Caecum*, D – Darm, Le – Leber, Cx – *Cortex*, Cb – *Cerebellum*

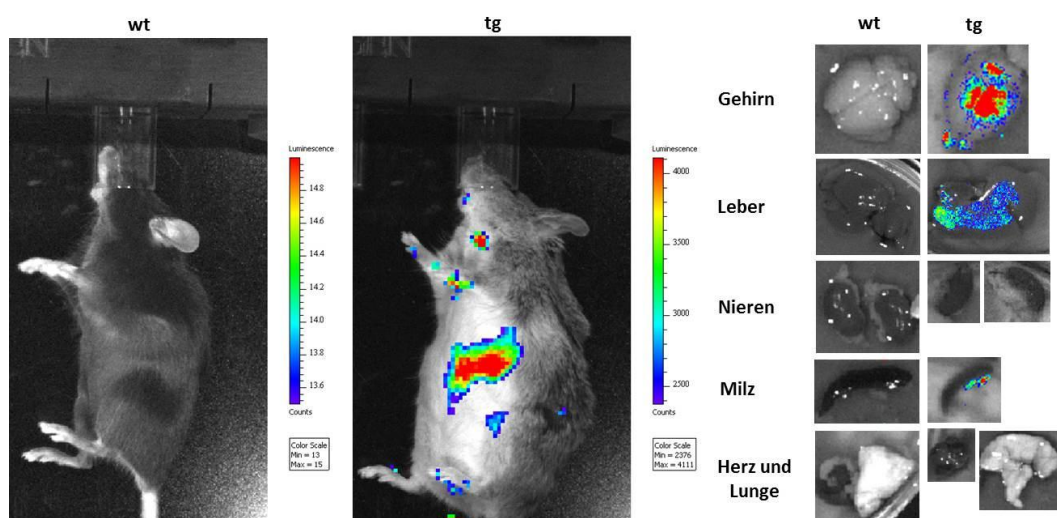


Abbildung 4.22 – Luciferase Bildgebung einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäusen: Im wildtypischen Tier gab es kein Lumineszenzsignal, während im doppelt-transgenen Tier die Haut ein Signal abgab. Bildgebung der entnommenen Organe, zeigte Luciferase Aktivität im Gehirn und in der Leber.

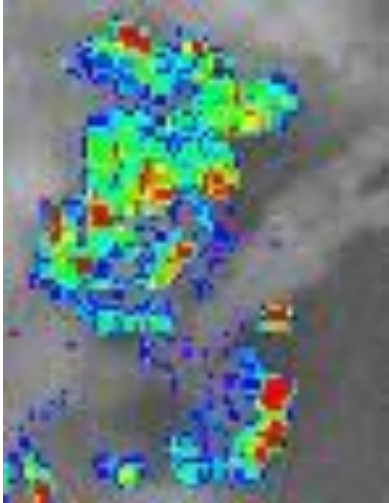


Abbildung 4.23 – Luciferase Imaging von Pankreasgewebe einer doppelt-transgenen Lsl-MYC;GFAP-Cre Maus: In dem Gewebe ist ein deutliches Signal der Luciferase zu erkennen

Bei dem Versuch *in-vivo Imaging* von Lsl-MYC;GFAP-Cre Tieren durchzuführen, stellte sich das Problem, dass GFAP neben dem Cerebellum und dem Pankreas auch in anderen Geweben wie der Haut exprimiert wird (Danielyan *et al.*, 2007). Aus diesem Grund ergab sich bei der Bildgebung das Problem, dass das starke Lumineszenzsignal der Haut ein *in vivo* Luciferase-Imaging des Tumors überlagerte (Abb. 4.22). Daher wurden die Tiere nach der Luciferin-Injektion schmerzfrei getötet, die Organe entnommen und erneut analysiert. Wie erwartet zeigte sich in den Organen der Kontrolle kein Signal. Das doppelt-transgene Tier zeigte ein Biolumineszenzsignal in der Leber und dem Gehirn (Abb. 4.22). Ebenfalls deutlich war ein starkes Signal im Pankreas (Abb. 4.23), aus dem die Tumore hervorgingen.

4.3.3 Tumorhistologie und Expression neuroendokriner Marker

Um das Ausgangsgewebe der Tumore zu bestimmen, wurden histologische Präparate angefertigt. Hämatoxylin und Eosin Färbungen bestätigten die Lokalisation des Tumors im Pankreasgewebe (Abb. 4.24 A und B). Der Tumor zeichnete sich durch dichte, runde, kleine Zellen aus und war gut vaskularisiert (Abb. 4.24 A). Die Zellen wiesen nur einen einzelnen Nukleus auf, was auf geringe Aggressivität des Tumors hindeutete. Dies konnte durch eine Ki67 Färbung, ein Marker für Proliferation, bestätigt werden: Es waren nur wenige Zellen Ki67 positiv, der Tumor war nur wenig proliferativ (Abb. 4.24 C). Eine Färbung auf Chromogranin A zeigte, dass es sich um einen neuroendokrinen Tumor handelte (Abb. 4.24 D).

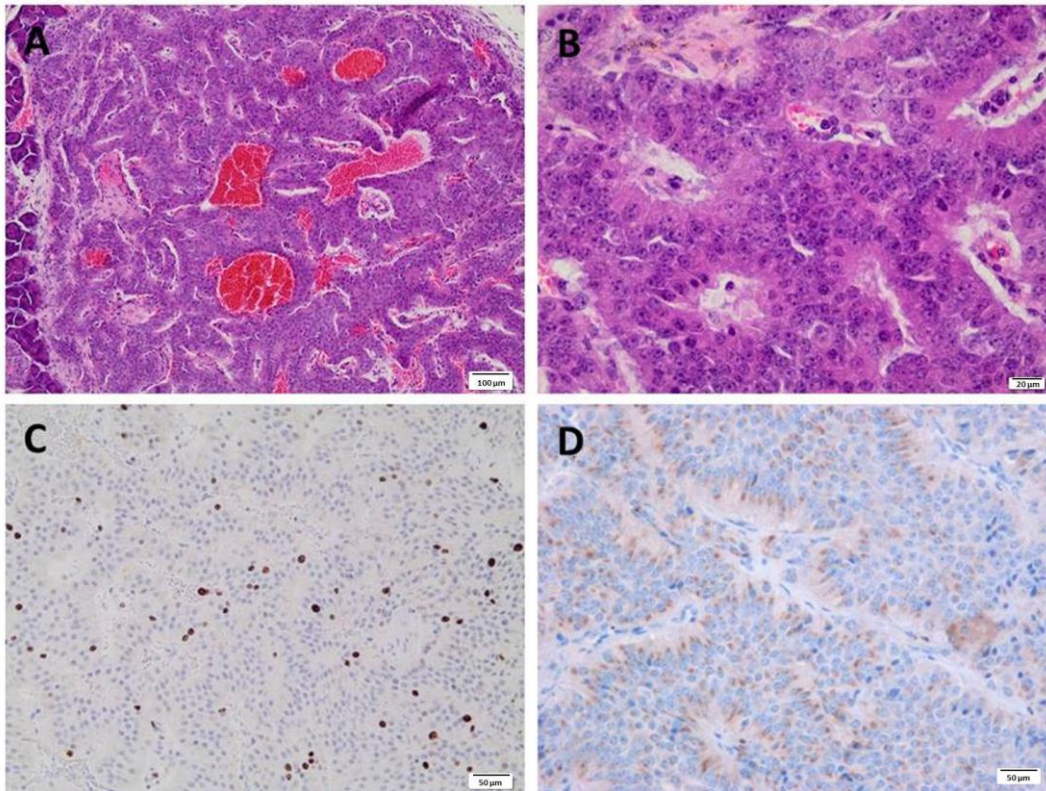


Abbildung 4.24 – Histologie des Pankreastumors einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus: Die Hämatoxylin und Eosin Färbung eines Pankreastumors (**A-B**) zeigte kleine, runde Zellen mit singulären Zellkernen und guter Vaskularisierung. Die Ki67 Färbung zeigte nur geringe Proliferationsraten (**C**). Eine positive Färbung auf Chromogranin A wies auf eine neuroendokrine Aktivität des Tumors hin (**D**).

Zur genaueren Lokalisation des Ursprungsgewebes wurden die Langerhans'schen Inseln des Pankreas untersucht, die Strukturen, die für die Hormonproduktion verantwortlich sind. Langerhans'sche Inseln setzen sich vor allem aus β -Zellen, die für Insulin Produktion verantwortlich sind, δ -Zellen, die Somatostatin produzieren und α -Zellen, für die Glukagonproduktion, zusammen. Eine Hämatoxylin und Eosin Färbung der Inselzellen, zeigte deutlich, dass das Tumorgewebe den Inselzellen entsprang (Abb. 4.25).

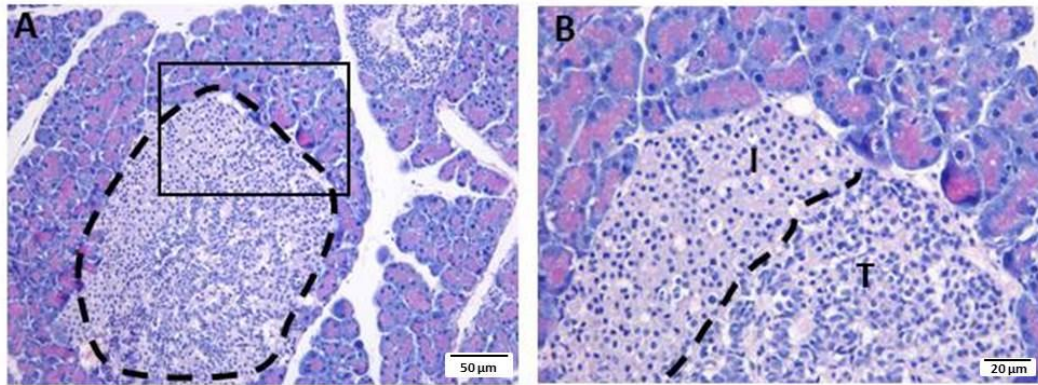


Abbildung 4.25 – Histologie der Langerhans'schen Inseln im Pankreasgewebe einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre doppelt-transgenen Maus: Die Langerhans'schen Inseln liegen im exokrinen Pankreasgewebe (A). Der Tumor (T) entspringt dem Inselgewebe (I) (B). Die Abbildungen zeigen HE-Färbungen.

Einige Tiere entwickelten neben den Pankreastumoren auch Tumore im Gehirn. Histologische Untersuchungen zeigten, dass es sich um Tumore der Adenohypophyse handelt. Abbildung 4.26 A und B zeigen Abbildungen einer gesunden Hypophyse der Maus, die sich aus Adenohypophyse (Hypophysenvorderlappen), Neurohypophyse (Hypophysenhinterlappen) und dem Pars intermediale (Zwischenlappen) zusammensetzt. Betrachtet man das Erscheinungsbild des erkrankten Mäusegehirns, so zeigt sich eine Tumorbildung im Bereich der Hypophyse (Abb. 4.26 C-D). In der Hämatoxylin und Eosin Färbung zeigen sich kleine, runde und einkernige Zellen (Abb. 4.26 E). Der Tumor war zudem gut vaskularisiert (Abb. 4.26 C). Da es in der Adenohypophyse zur Hormonproduktion kommt, wurde das Gewebe auch auf Chromogranin A Expression untersucht (Abb. 4.26 F). Auch die Hirntumore exprimierten Chromogranin A, es handelte sich demnach ebenfalls um neuroendokrine Tumore.

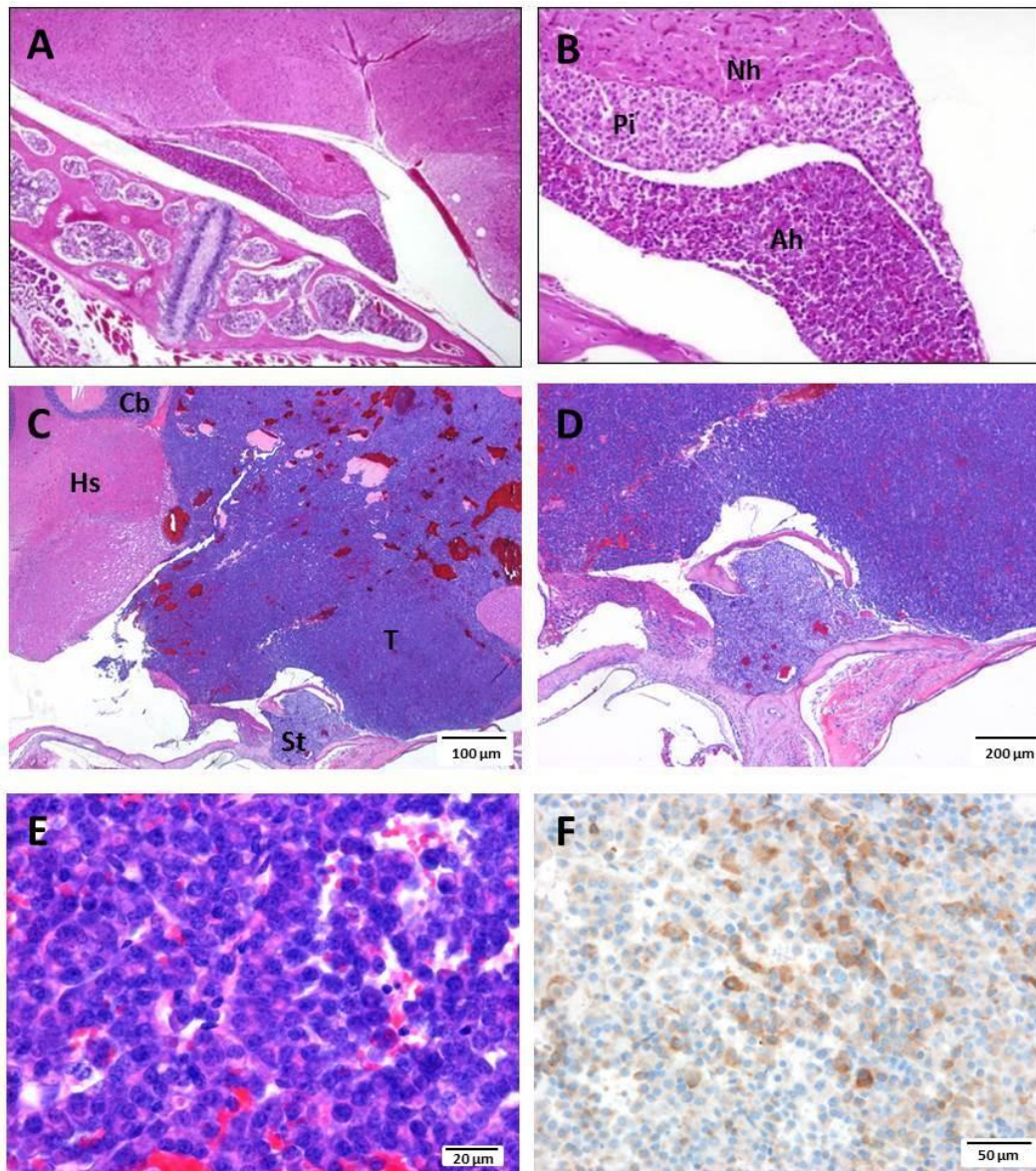


Abbildung 4.26 – Histologie des Hirntumors einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus: HE-Färbungen der Hypophyse einer gesunden Maus (A-B), und das entsprechende Gewebe in einer tumortragenden Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus (C-E). Färbungen zeigen dichte, einkernige Zellansammlungen, die auf einen Tumor der Adenohypophyse hindeuten. Die Chromogranin A Färbung bestätigte einen neuroendokrinen Ursprung (F). Abbildungen A und B wurden dem *Atlas of laboratory mouse histology* entnommen. Pi – *Pars intermediale*, Nh– Neurohypophyse, Ah– Adenohypophyse, Hs– Hirnstamm, T– Tumorgewebe, Cb– Cerebellum, St– *Stella turcica*

4.3.4 Glukagon- und Insulinbestimmung in Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäusen

Die Inselzellen des Pankreas produzieren Hormone wie Insulin und Glukagon. Bertelli et al. beschrieb, dass die α -Zellen des Pankreas GFAP positiv sind (Bertelli *et al.*, 2000), was mit der Hypothese der Tumorentstehung in α -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus vereinbar ist. Menschen mit Tumoren der pankreatischen α -Zellen, einem sogenannten Glukagonom, zeichnen sich unter anderem durch stark erhöhte Glukagonlevel im Blut aus (Christopoulos, 2001). Die Tumore sowie das Blut tumortragender Mäuse wurden auf Glukagon untersucht. Untersuchtes Tumorgewebe zeigte eine positive immunhistochemische Färbung gegen Glukagon (Abb.4.27 A). Als nächstes wurde das Blut von tumortragenden Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäusen mit dem Blut von wildtypischen Mäusen verglichen. Bei diesen Analysen konnten wir zwei Gruppen unterscheiden – zum einen Mäuse, deren Glukagonspiegel im Blut sich nicht von denen wildtypischer Mäuse unterschieden und zum anderen Mäuse, deren Glukagonspiegel signifikant erhöht war ($p=0,0002$) (Abb. 4.27 B). Die Insulinwerte der untersuchten Tiere unterschieden sich nicht voneinander (Abb. 4.27 C).

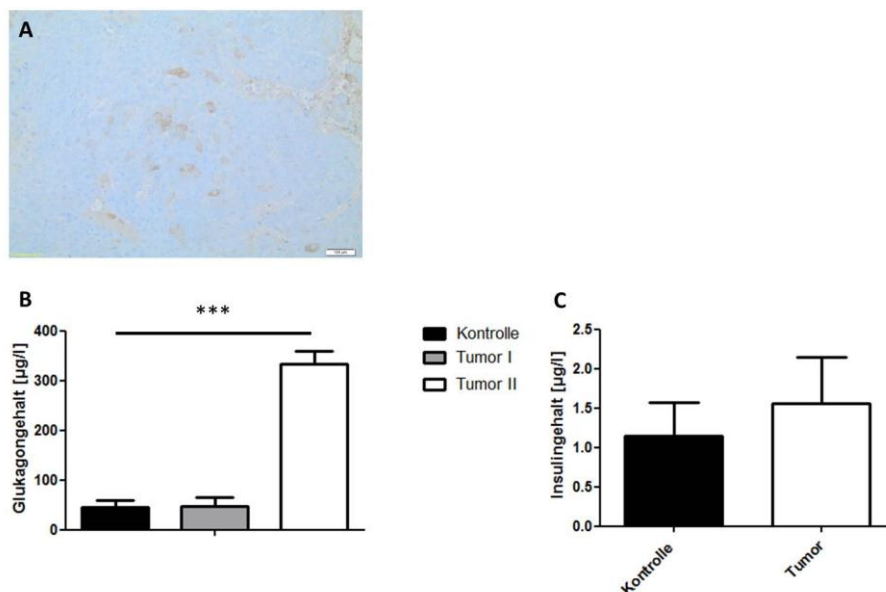


Abbildung 4.27 – Glukagon- und Insulingehalt in Tumor und Blut einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus: Immunhistochemische Färbungen zeigte Anwesenheit von Glukagon im Tumor (A). Untersuchungen des Mäusebluts von doppelt-transgenen (Tumor) im Gegensatz zu wildtypischen (Kontrolle) Mäusen zeigten zum Teil unveränderte (Tumor I) und signifikant erhöhte (Tumor II) Glukagonwerte ($P= 0,0002$) (B). Der Insulingehalt im Mäuseblut war gegenüber Kontrolltieren unverändert (C). Die Graphen zeigen Mittelwerte und Mittelabweichungen aus $n=4$ Experimenten und jeweils $n=3$ Blutproben tumortragender Tiere bzw. Kontrollen.

4.3.5 Lsl-MYCN;GFAP-Cre Tumore weisen keine genomischen Aberrationen auf

Um durch MYCN Überexpression entstandene genomische Aberrationen in Geweben der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus zu identifizieren, wurden aCGHs von Pankreas- und Hirntumoren im Vergleich zu gesundem Milzgewebe angefertigt. Es konnten keine Unterschiede zwischen Lsl-MYCN;GFAP-Cre Tumoren und normalem Gewebe nachgewiesen werden (Abb. 4.28).

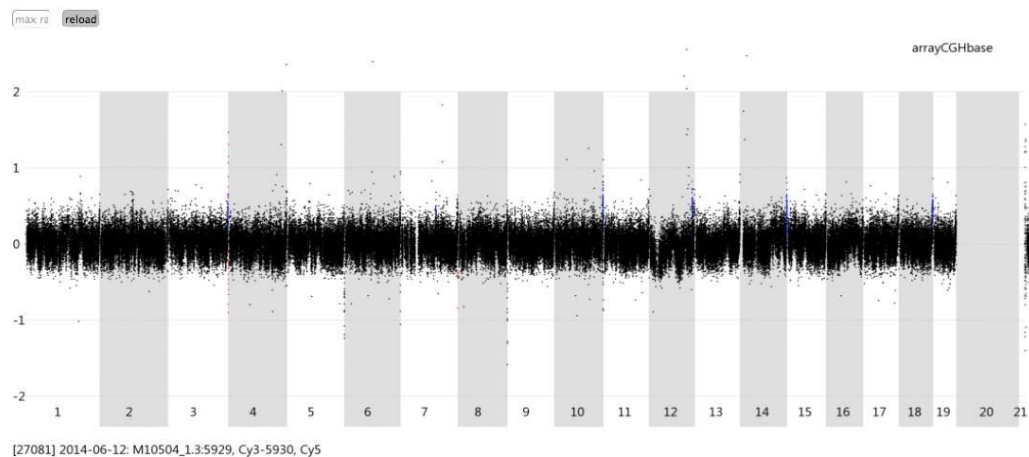


Abbildung 4.28 – Darstellung der aCGH Analyse eines Lsl-MYCN;GFAP-Cre Tumors: Die Ergebnisse der Analyse zeigten keine Auffälligkeiten der Tumore im Vergleich zu Kontrollen. Die Abbildung zeigt das repräsentative Ergebnis der Analyse der DNA eines Pankreastumors.

4.3.6 mRNA Profiling

Zur Detektion von Genexpressionsveränderungen in den Lsl-MYCN;GFAP-Cre Tumoren wurden mRNA Profile unter Verwendung von Affymetrix Arrays erstellt. Bei der Präparation der Kontroll-RNA für diese Analyse ist es uns nicht gelungen, RNA mit ausreichender Qualität aus gesunden Pankreata zu gewinnen. Eine Ursache liegt in den hohen RNase Leveln, die in dem Organ vorliegen. So finden sich beispielsweise im Pankreas einer Ratte RNase A Level von 200µg/g (Beintema *et al.*, 1973). Als Kontrolle dienten uns daher Datensätze aus der GEO-Datenbank des NCBI (GSM771025.CEL; GSM771026.CEL und GSM771027.CEL). Analysiert wurden singuläre Pankreastumore sowie Pankreas- und Hirntumore aus Tieren, die beide Tumore vorwiesen. Die Analysen zeigten wenige Auffälligkeiten. Die am stärksten regulierten Gene waren Cholezystokinin (Cck) in Pankreastumoren und Prolaktin (Prl) in Hirntumoren.

4.3.7 Zelllinien und Xenografts

Aus einem Pankreastumor einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus wurde die Zelllinie „Pank 4“ auskloniert, nach differenzierter und undifferenzierter Morphologie unterschieden und zur Generierung von Xenografts in Nacktmäuse gegeben. Biolumineszenzdarstellungen zeigten, dass die in Xenografts entstehenden Tumore nach Luciferininjektion Luciferin-Aktivität zeigen (Abb. 4.29). Dieses Signal weist darauf hin, dass in den entstehenden Tumoren auch weiterhin MYCN transkribiert wird.

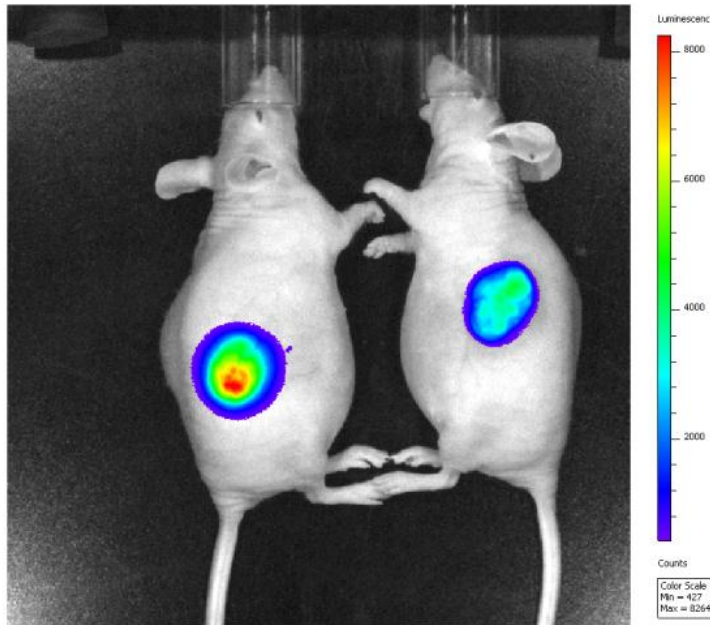


Abbildung 4.29 – In vivo Imaging der IIID2 Xenografts: Der aus der Pank 4 Zelllinie generierte Klon IIID2 weist in Xenografts ein Luciferasesignal auf. Die Darstellung der IIID2 Xenografts ist repräsentativ für alle generierten Xenograftmodelle.

Aus den Xenografttumoren wurden wiederum Zelllinien gewonnen – IC11 Xeno und IIID2 Xeno. Die fünf Glukagonomzelllinien (Pank 4, IC11, IC11 Xeno, IIID2 und IIID2 Xeno) (Abb. 4.30 A-D) wurden auf das Herausschneiden der Polyadenyl-Stoppsequenz untersucht. Die Stoppsequenz wurde in allen Zelllinien ausgeschnitten (Abb. 4.30 F)

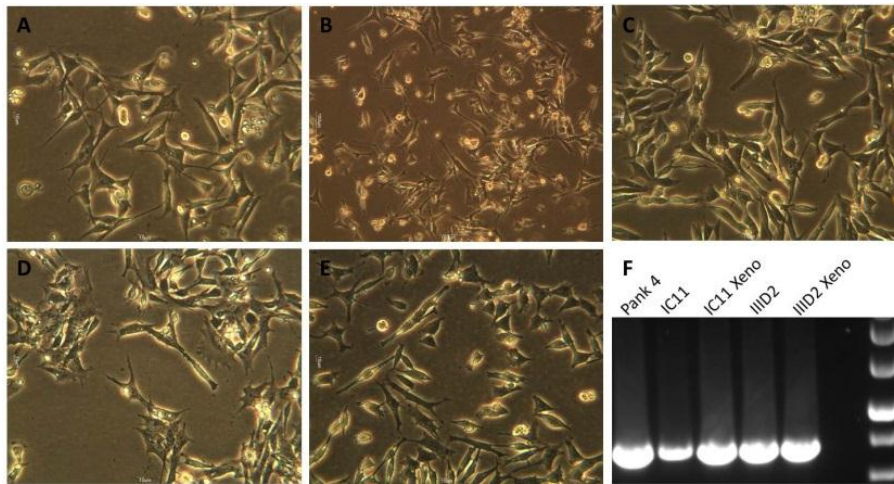


Abbildung 4.30 – Vergleich der Pankreaskarzinomzelllinien Pank 4, IC11, IC11 Xeno, I11D2 und I11D2 Xeno: Morphologie der Pank4 (A) IC11 (B), IC11 Xeno (C), I11D2 (D) und I11D2 Xeno (E) Zelllinien. Die Zellfortsätze der IC11 Zelllinie zeigten eine Differenzierung an, während die I11D2 Zelllinie undifferenziert war. PCR Untersuchungen zeigten, dass es in allen Zelllinien zu einem „Flox-out“ der Stoppssequenz kam, es lag eine Bande bei 702 bp (F) vor.

4.3.8 Indirekte MYCN Inhibition durch Behandlung von Xenografts mit JQ1 und MLN 8237

Xenografts der Glukagonomzelllinie Pank 4 wurden täglich einmal mit JQ1, MLN 8237 oder DMSO, als Kontrolle, behandelt. Die Tumore wurden täglich vermessen. Eine Behandlung mit JQ1 bzw. MLN 8237 hatte eine signifikant verminderte Tumorgroße im Vergleich zu DMSO behandelten Tieren zu Folge (Tag 9 JQ1 $p=0,007$, MLN 8237 $p=0,003$; Tag 13 JQ1 $p=0,05$, MLN 8237 $p=0,02$) (Abb. 4.31 A). Eine Kaplan-Meier Analyse zeigte außerdem, dass MLN 8237 behandelte Tiere eine signifikant höhere Überlebenswahrscheinlichkeit aufwiesen als Kontrolltiere ($p=0,013$) (Abb. 4.31 B). Eine histologische Untersuchung von Pank 4 Xenograft Tumoren von zwei Mal täglich mit JQ1, MLN 8237 oder DMSO behandelten Tieren (Abb. 4.32 A), ergab eine signifikant reduzierte Anzahl von Ki 67 positiven und demnach proliferierenden Zellen (JQ1 $p=0,04$; MLN 8237 $p=0,03$) (Abb. 4.32 B). Die, durch eine Caspase 3 Färbung nachgewiesene Anzahl von apoptotischen Zellen war hingegen signifikant erhöht (JQ1 $p=0,012$; MLN 8237 $p<0,0001$) (Abb.4.32 C).

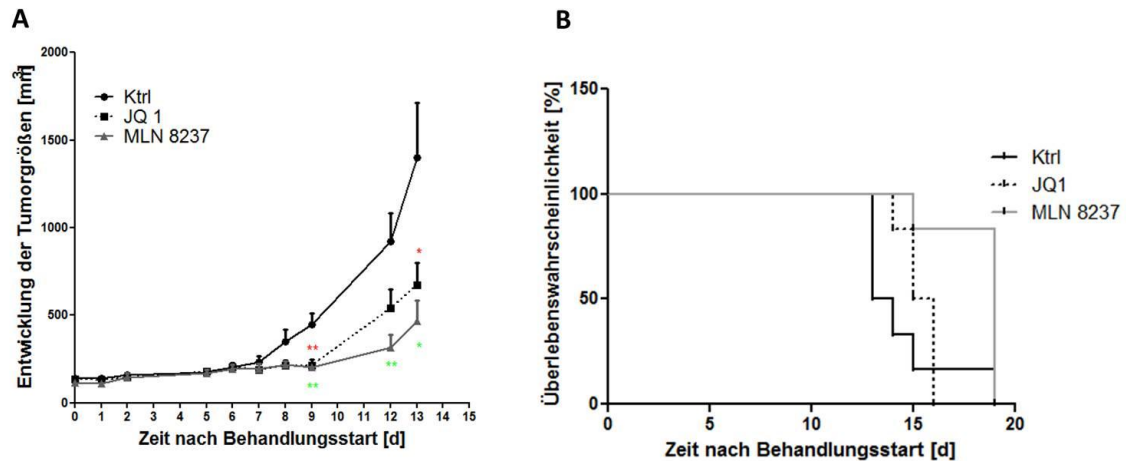


Abbildung 4.31 – Darstellung der Tumorentwicklung von Pank 4 Xenografts unter DMSO, JQ1 und MLN 8237 Behandlung: Eine tägliche Behandlung mit JQ1 bzw. MLN 8237 verringerte das Tumolvolumen im Vergleich zu DMSO behandelten Tieren signifikant (Tag 9 JQ1 $p=0,007$, MLN 8237 $p=0,003$; Tag 13 JQ1 $p=0,05$, MLN 8237 $p=0,018$) (A). Die Überlebenswahrscheinlichkeit von MLN 8237 behandelten Mäusen war gegenüber DMSO behandelten Tieren signifikant erhöht ($p=0,013$) (B). In jede Gruppe wurden $n=6$ Tiere einbezogen.

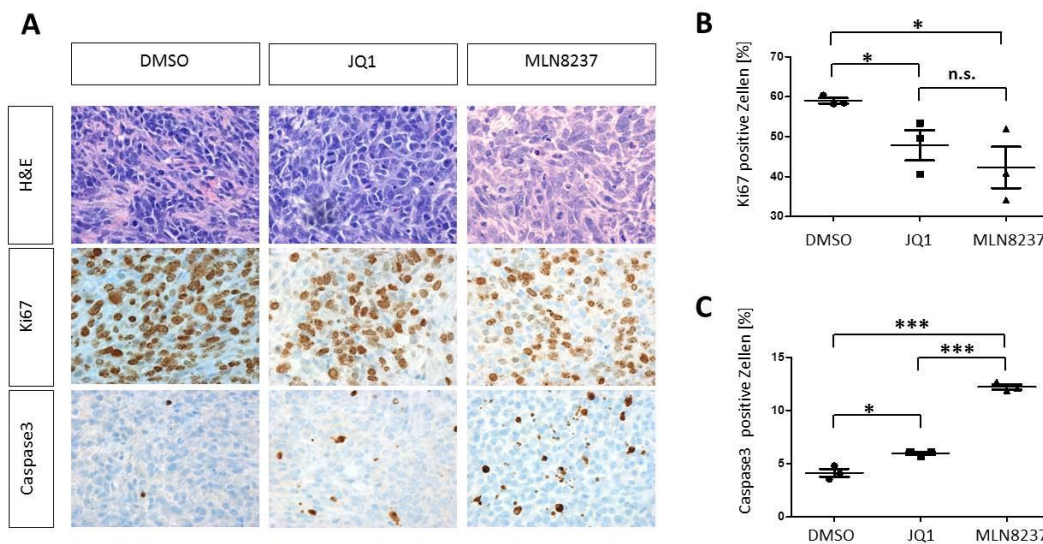


Abbildung 4.32 – Histologische Untersuchung von Pank 4 Xenograft Tumoren nach Behandlung mit DMSO, JQ1 oder MLN 8237: HE Färbungen der Tumore, im Vergleich zu Ki 67 und Färbungen der Caspase 3 (A). Eine statistische Untersuchung der Färbungen zeigte eine signifikant geringere Proliferationsrate (JQ1 $p=0,0441$; MLN 8237 $p=0,0336$) (B) und signifikant erhöhte Zahlen apoptotischer Zellen (JQ1 $p=0,012$; MLN 8237 $p<0,0001$) (C) nach JQ1 und MLN 8237 Behandlung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei Auszählungen von jeweils drei Präparaten.

4.3.9 Untersuchung der Sensitivität gegenüber JQ1 und MLN 8237 Behandlung *in vitro* nach serieller Transplantation

Um die Zellen angepasst zu behandeln, wurden zunächst durch Zellviabilitätsmessungen die IC50s der Zelllinien für die beiden Substanzen bestimmt. In Abbildung 4.33 ist zu erkennen, dass überraschenderweise die Therapie-naive Zelllinie IID2 Xeno, gegenüber ihrer Ursprungszelllinie IID2 auf beide Inhibitoren signifikant resistenter reagiert (JQ1 $p=0,03$, MLN 8237 $p=0,03$). In einer zweiten Zelllinie, IC11, war kein Unterschied in der Sensitivität gegenüber JQ1 und MLN8237 vor (IC11) und nach erneuter Transplantation (IC11 Xeno) als Xenograft festzustellen.

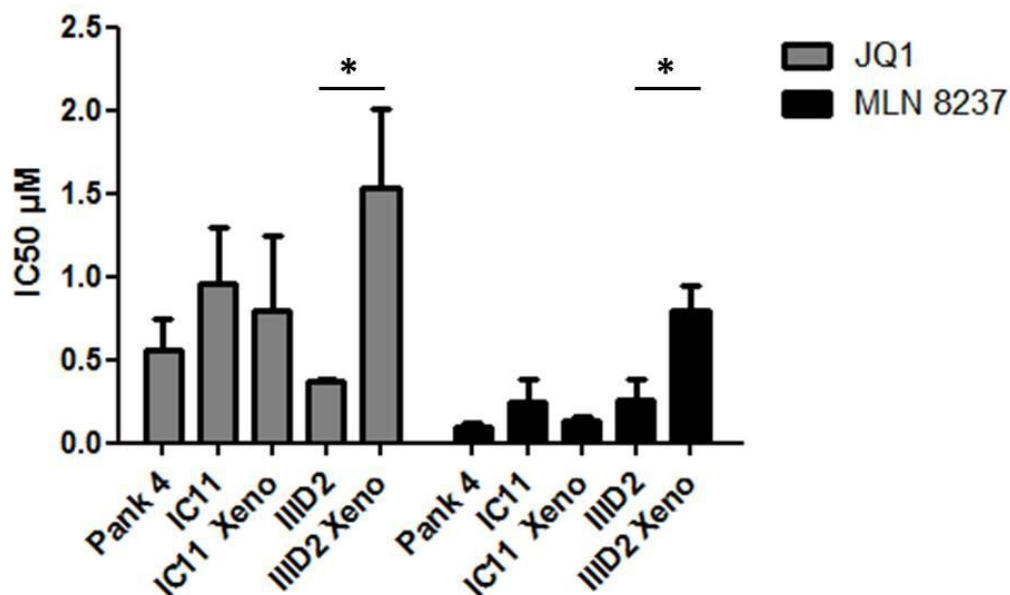


Abbildung 4.33 – IC50 Werte der gewonnenen Pankreaszelllinien unter JQ1 bzw. MLN 8237 Behandlung: Alle fünf Pankreaszelllinien, Pank 4, IC11, IC11 Xeno, IID2 und IID2 Xeno reagieren auf die Inhibitoren JQ1 und MLN 8237. Die Xenograft Zelllinie IID2 reagiert auf beide Inhibitoren resistenter als die Zelllinie IID2 (JQ1 $P=0,0339$, MLN 8237 $P=0,0357$). Der Graph zeigt Mittelwerte und Mittelabweichung aus $n=3$ Experimenten.

5. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war, MYCN-abhängige Faktoren *in vivo* und MYCN unabhängige Faktoren für kindliche Tumorerkrankungen *in vitro* zu ermitteln und zu untersuchen. Gegenstand dieser Untersuchungen waren die MYCN unabhängig exprimierte Histondemethylase JARID1C, sowie das durch gezielte MYCN Expression getriebene Glukagonommodell der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus.

5.1 Die Rolle der Histondemethylase JARID1C im Neuroblastom

In diesem Teil der Arbeit untersuchten wir die durch bioinformatische Methoden identifizierte Histondemethylase JARID1C, deren Expression in Hochrisikopatienten mit Neuroblastom unabhängig vom MYCN-Status einen prognostischen Parameter darstellt. Das Protein wurde im Hinblick darauf untersucht, ob es im pädiatrischen Tumormodell Faktoren wie Zellwachstum und Zelltod beeinflusst.

5.1.1 Expression von JARID1C in Primärtumoren und MYCN *single copy* und MYCN amplifizierten Zelllinien

Die Amplifikation des Onkogens MYCN wird im Neuroblastom mit einer aggressiven Krankheits-Entwicklung und schlechter Prognose assoziiert (Brodeur *et al.*, 1984). Die Informatiker Katharina Morik und Benjamin Schowe entwickelten einen Algorithmus, der mit Hilfe von Merkmalsselektion und Stützvektormethoden mRNA-Expressionsdaten von Neuroblastompatienten zur Klassifikation einsetzte (Schowe, 2011). Mit diesem Algorithmus wurde die Histondemethylase JARID1C identifiziert, von der wir zeigen konnten, dass sie in Primärtumoren unabhängig vom MYCN-Status mit schlechter Prognose assoziiert ist. Um ein genaueres Verständnis der Funktion des Proteins für die Krebszelle zu bekommen, wurde seine Expression in Zelllinien weiter untersucht. Die Expression der Histondemethylase ist in allen untersuchten Neuroblastomzelllinien nachweisbar und ist dabei unabhängig vom Amplifikationsstatus von MYCN.

Die JARID1C Lokalisation in Neuroblastomzellen war zelllinienspezifisch: in SHEP Zellen wurde JARID1C im Zellkern und in IMR5 Zellen vor allem im Cytoplasma nachgewiesen. Niu et al. konnten im Nierenzellkarzinom zeigen, dass JARID1C im Gegensatz zu JARID1A

und JARID1B nukleär und cytoplasmatisch vorliegt, wobei die Expressionslevel von der Expression des von Hippel-Lindau (vHL) Tumorsuppressorgens und HIF abhängig sind (Niu *et al.*, 2012). Auch Kim *et al.* beschreiben cytoplasmatisches JARID1C, wobei es in diesem Fall als Isoform der Histondemethylase beschrieben wird (Kim *et al.*, 2008). Die cytoplasmatische Lokalisation von JARID1C könnte ein Hinweis darauf sein, dass es neben der Demethylierung der Histone weitere Reaktionen beeinflusst.

Für die Histondemethylase LSD1 ist neben der Demethylierung der Lysine H3K4 und H3K9 (Shi *et al.*, 2004), eine Methylierung von p53 mit nachfolgender Blockade der p53 mediierte Transkription beschrieben (Huang *et al.*, 2007). Analoge Funktionen für JARID1C sind bisher noch unbekannt.

5.1.2 Effekte des siRNA vermittelten *knock-downs* von JARID1C in Neuroblastom Zelllinien

Um Informationen über die Rolle von JARID1C für die Neuroblastombiologie zu gewinnen, wurde ihre Expression durch siRNA inhibiert. Die Effizienz des *knock-downs* wurde mittels qPCR und Western Blot Analysen verifiziert und die Zellen im Hinblick auf Unterschiede in Morphologie, Zellteilung und Apoptose untersucht.

Werden SY5Y Neuroblastomzellen mit siRNA gegen die Histondemethylase LSD1 behandelt, zeigt sich eine signifikant verringerte Zellviabilität und morphologische Unterschiede (Schulte *et al.*, 2009). Diese Daten zeigen Ähnlichkeit zu unseren Ergebnissen: ein JARID1C *knock-down* führte ebenfalls zu Unterschieden im Phänotyp, die Zellviabilität wurde signifikant reduziert, während Apoptoseraten signifikant gesteigert wurden.

Sowohl LSD1 als auch JARID1C demethylieren H3K4 (Shi *et al.*, 2004; Iwase *et al.*, 2007; Christensen *et al.*, 2007). Der Methylierungsgrad von H3K4 wird mit der Aktivierung der Genexpression verbunden (Vermeulen *et al.*, 2007; Martin und Zhang, 2005). Durch eine Überexpression von JARID1C werden die H3K4me3 und H3K4me2 Level in HeLa Zellen beinahe gänzlich reduziert (Christensen *et al.*, 2007), was in Thymuszellen vom Kalb bestätigt wurde (Iwase *et al.*, 2007). Obwohl die zwei Demethylasen das gleiche Lysin am Histon H3 demethylieren, sind ihre Funktionen jedoch nicht grundlegend miteinander vergleichbar. LSD1 demethyliert H3K4me2 und H3K4me1, während JARID1C H3K4me3 und H3K4me1 demethyliert (Iwase *et al.*, 2007). Die Trimethylierung des vierten Lysins am Histon H3 wird

mit aktiven Promotoren assoziiert, während seine Mono- und Dimethylierung mit aktiven Enhancern in Verbindung gebracht wird.

In weiteren Western Blot Analysen konnten wir zeigen, dass ein siRNA vermittelter *knock-down* von JARID1C zu einer Verschiebung des Methylierungsstatus in SHEP und IMR5 Zellen führte. Wir konnten zeigen, dass sich nach JARID1C-siRNA Transfektion die Mengen von trimethyliertem Lysin H3K4 erhöhten, wohingegen die Monomethyl-H3K4 Level sanken. Da es durch die siRNA Behandlung zu einer Unterbindung der Demethylaseaktivität von JARID1C kommt, bestätigen diese Ergebnisse die Funktionalität und Spezifität der siRNA.

Tahiliani et al. beschrieben neben der Demethylaseaktivität eine Funktion von JARID1C als transkriptionalem Repressor in HeLa-Zellen (Tahiliani *et al.*, 2007). Sie postulierten, dass eine Komplexbildung von JARID1C mit dem *RE-1 silencing transcriptional factor* (REST) die Bindung von JARID1C an die DNA ermöglicht.

Um zu untersuchen, welche Gene durch die veränderte Methylierung beeinflusst werden und für die Unterschiede in Morphologie, Apoptose und Viabilität verantwortlich sind, wurden Expressionsprofile nach JARID1C *knock-down* erstellt. Wir konnten jedoch keine signifikant regulierten Protein-kodierenden Zielgene identifizieren. Daher weiteten wir die Analysen auf nicht kodierende Gene aus. Etwa 70% des Genoms werden transkribiert, wobei nur 2% für Proteine kodieren, die restlichen 68% machen funktionelle, nicht kodierende RNAs aus – microRNAs und *long non-coding* RNAs (lncRNAs) (Diederichs, 2010). Es zeigte sich bei qPCR Analysen, dass die lncRNA Malat1 nach siRNA Transfektion gegen JARID1C in SHEP und IMR5 Zellen erhöht exprimiert wurde. Die lncRNA Malat 1 wurde zunächst im Lungenkarzinom beschrieben, wo sie vor allem in metastasierenden Fällen hoch exprimiert und mit schlechter Prognose assoziiert wird (Ji *et al.*, 2003). Tee et al. konnten zeigen, dass die Histondemethylase JMJD1A durch MYCN reguliert werden kann und dass JMJD1A die Expression von Malat 1 in BE(2)-C und CHP134 Neuroblastomzelllinien beeinflusst, wodurch Zellmigration und –invasion induziert wird (Tee *et al.*, 2014). Durch ein qPCR *Screeing* untersuchten wir SHEP Zellen nach siRNA Transfektion gegen JARID1C und bestätigten Malat 1 und andere lncRNAs als mögliche JARID1C Zielstrukturen. In primären Neuroblastomen zeigten sich allerdings keine Korrelationen zwischen der Expression von JARID1C und den erwähnten lncRNAs. Die beiden anderen durch JARID1C siRNA verändert exprimierten lncRNAs Xist und Neat-1 wurden bisher nicht im Zusammenhang mit dem Neuroblastom beschrieben. Andere nicht kodierende RNAs, wie beispielsweise die microRNA miR-137, beeinflussen die Neuroblastombiologie durch die Wechselwirkung mit

Histondemethylasen. Beispielsweise ist LSD1 ein Zielgen der miR-137 microRNA und wird durch sie supprimiert (Althoff *et al.*, 2013).

5.1.3 Effekte der Pbit vermittelten Inhibition von JARID1C in Neuroblastom Zelllinien

2013 stellten Sayegh *et al.* das Molekül Pbit vor, ein Derivat von Benzisothiazolion (BIT), das vor allem als Fungizid und Mikrobiozid in Reinigungsmitteln vorkommt (Dou *et al.*, 2011). In Brustkrebszelllinien inhibiert Pbit die Histondemethylasen JARID1B und JARID1C (Sayegh *et al.*, 2013). Wir verwendeten den Inhibitor, um in SHEP und IMR5 Zellen die JARID1C Funktion zu unterbinden. SHEP und IMR5 Zellen zeigten nach Pbit Behandlung morphologische Unterschiede sowie erhöhte Apoptoseraten. Im Unterschied zur Reaktion auf JARID1C siRNA Behandlung zeigte sich jedoch keine Veränderung im Methylierungsstatus von H3K4. Wird die Histondemethylase LSD1 durch Monoaminoxidase Inhibitoren gehemmt, kommt es zu einem globalen Anstieg der H3K4 Methylierung in Neuroblastomzelllinien (Schulte *et al.*, 2009). Vergleichbar wäre dies in Pbit behandelten Zellen zu erwarten gewesen, da nicht nur JARID1C, sondern auch JARID1B inhibiert wird, wodurch der Effekt hätte erwartungsgemäß größer sein müssen, als nach siRNA Behandlung. Angesichts dessen bleibt unklar, ob die Pbit induzierte Apoptose ein Effekt der Histondemethylaseinhibition ist. Einen möglichen Hinweis stellt die cytoplasmatische Lokalisation von JARID1C dar, sodass möglicherweise andere Zielstrukturen und Funktionen, die durch Pbit inhibiert werden, die cytostatische Aktivität von Pbit bewirkt.

5.1.4 Relevanz von Histondemethylasen für die Neuroblastombiologie

Durch bioinformatische Methoden wurden aus mRNA Profilen von Neuroblastompatienten Gene identifiziert, die in Hochrisikopatienten hochreguliert und dabei unabhängig von MYCN exprimiert wurden. Wir konnten die Histondemethylase JARID1C als eines dieser Gene verifizieren und zeigen, dass seine Expression essentiell für das Überleben der Neuroblastomzelle ist. Der Inhibitor Pbit, der sich gegen JARID1C und JARID1B richtet, war zwar in der Lage in untersuchten Neuroblastomzellen Apoptose auszulösen, jedoch war dies vermutlich nicht der Demethylierung von Lysinen an Histonen geschuldet. Demnach ist es erstrebenswert, die Funktion von Pbit in Neuroblastomzellen weiter zu untersuchen oder einen JARID1C spezifischeren Inhibitor zu entwickeln. Generell ist die Destabilisierung von

Histondemethylasen ein interessanter Ansatz zur Induktion von Differenzierung und Apoptose von Neuroblastomzellen (Han *et al.*, 2014). Neben dem Neuroblastom konnte die Relevanz von Histondemethylasen auch in anderen Tumorentitäten wie dem Medulloblastom bewiesen werden (Pajtler *et al.*, 2013).

5.2 Modellierung MYCN getriebener Mausmodelle für pädiatrische Tumormodelle

In diesem Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob durch eine gezielte Überexpression von MYCN in ausgewählten Zielgeweben Tumorerkrankungen modelliert werden können.

Für das Neuroblastom sind bereits unter anderem das TH-MYCN Mausmodell bekannt, das 1997 von Weiss *et al.* entwickelt wurde und in dem murine Neuroblastome durch MYCN Expression unter der Kontrolle des Tyrosinhydroxylase (TH) Promotors entstehen (Weiss *et al.*, 1997). Ein weiteres transgenes, MYCN getriebenes Mausmodell für Neuroblastome ist das DBHi-Cre;Lsl-MYCN Modell, indem MYCN in DBHi exprimierenden Geweben exprimiert wird und so in der Nebenniere und Cervicalganglien Neuroblastome hervorrufen kann (Althoff *et al.*, 2014). Es existieren Mausmodelle für drei der vier Subtypen des Medulloblastoms, jedoch kein transgenes MYCN getriebenes Modell. Für den Wnt-Subtyp des Medulloblastoms wurde 2010 ein Mausmodell beschrieben, bei dem aktivierende β -Catenin-Mutanten in Verbindung mit einer Deaktivierung von TP-53 Kleinhirntumore erzeugen (Gibson *et al.*, 2010). Hatton *et al.* beschrieben 2008 ein *Smoothed* getriebenes Mausmodell, im dem SmoA1 in Granulozytenvorläuferzellen exprimiert wurde (Hatton *et al.*, 2008). Durch eine Expression von konstitutiv aktiviertem *Smoothed* (SmoM2) in GFAP positiven Granulozytenvorläuferzellen konnte ebenfalls eine Medulloblastombildung in GFAP-Cre;SmoM2 Mäusen induziert werden (Schuller *et al.*, 2008). Für die Gruppe der MYCN-getriebenen Medulloblastome, existiert bisher nur ein transplantierbares, aber kein genetisches Modell (Swartling *et al.*, 2010). In dieser Arbeit sollte ein Medulloblastommodell mit gezielter MYCN Expression in den frühen Stadien der Mausentwicklung induziert werden, wozu Lsl-MYCN Mäuse mit Nestin-Cre Mäusen, Math-1-Cre Mäusen bzw. GFAP-Cre Mäusen verpaart wurde. Nestin, Math-1 und GFAP werden im Cerebellum in den für die Medulloblastomentstehung verantwortlichen Granulozyten und entsprechenden Zeitfenstern exprimiert.

Nestin wird ab Embryonaltag 15,5 in der Subventrikular- und Ventrikularzone des sich entwickelnden Cerebellums exprimiert (Dahlstrand *et al.*, 1995). Wird die Expression von

Nestin im Zebrafisch unterbunden, kommt es zu Defekten in der Ausbildung des Gehirns und der Augen (Chen *et al.*, 2010). Knoepfler nutzte eine Nestin-Cre Maus, um MYCN in neuronalen Progenitorzellen auszuschalten und konnte so eine MYCN Abhängigkeit der Hirnentwicklung nachweisen (Knoepfler *et al.*, 2002). Rao *et al.* beschrieb, dass Nestin exprimierende neuronale Vorläuferzellen als Ursprungszellen für Medulloblastome erachtet werden können (Rao *et al.*, 2003). Auch wird Nestin in der Shh Subgruppe der Medulloblastome, die zudem hohe MYCN Level aufweist, hoch exprimiert (Rao *et al.*, 2003). Die Lokalisation sowie das Zeitfenster der Nestin Expression im Cerebellum in Verbindung mit dem Nachweis, dass Nestin exprimierende cerebelläre Progenitorzellen eine erhöhte Tumorigenität zeigen (Li *et al.*, 2013) führten zu der Annahme, dass Nestin-positive Zellen geeignet für die Generierung eines Medulloblastom-Mausmodells sein könnten.

Die doppelt-transgenen Lsl-MYCN;Nestin-Cre Tiere entwickelten keine Tumore. Einige Tiere entwickelten zwar Hydrozephalen, jedoch wurden die Tiere dadurch kaum beeinträchtigt und zeigten im Erwachsenenalter keine Spätfolgen. Auffällig war dennoch, dass doppelt-transgene Tiere Probleme mit dem Magendarmtrakt aufwiesen. Das Ergebnis des Luciferase-Imagings zeigte deutlich ein Lumineszenzsignal im Verdauungstrakt, der Niere und dem Gehirn – dort vor allem im Cerebellum. Die Expression im Cerebellum bestätigt die gerichtete Expression im ursprünglichen Zielgebiet, die Über-Expression im Magendarmtrakt könnte ein Anhaltspunkt für die gesundheitlichen Probleme der Tiere darstellen. MYC spielt im Magenkarzinom eine große Rolle (Wang *et al.*, 2015). Zudem konnte gezeigt werden, dass bei einem konditionellen *knock-out* des MYC Antagonisten Mnt in Brustepithelzellen Entzündungen hervorgerufen werden (Dezfouli *et al.*, 2006). Möglicherweise trägt die MYCN Überexpression in den Magendarmgeweben der Lsl-MYCN;Nestin-Cre Tiere ebenfalls zu Entzündungen bei.

Auch Zwergenwuchs kann mit MYC Antagonisten assoziiert werden. Quéva *et al.* konnten zeigen, dass es bei einer Überexpression des MYC Antagonisten MAD1 in Mäusen zu Zwergenwuchs ohne sonstige morphologische Unterschiede kommt (Queva *et al.*, 1999). Allerdings ist unwahrscheinlich, dass der in doppelt-transgenen Lsl-MYCN;Nestin-Cre Tieren beobachtete Zwergenwuchs darin begründet liegt, da es eine gleichzeitige Überexpression von MYCN und seinem Antagonisten MAD1 bedeuten würde. Eine andere Möglichkeit den Zwergenwuchs doppelt-transgener Tiere zu erklären, sind die proapoptotischen Effekte von MYCN. Ein Zusammenhang zwischen MYC und erhöhten Apoptoseraten wurde bisher unter anderem in 32Dcl3 Zellen (Askew *et al.*, 1991; Askew *et al.*, 1993) und Ratten-Fibroblasten (Evan *et al.*, 1992) nachgewiesen. MYC induzierte Apoptose kann zum Beispiel durch die

Freisetzung von Cytochrom C (Juin *et al.*, 1999) oder die Aktivierung von Caspase 3 (Kagaya *et al.*, 1997) hervorgerufen werden. Eine PCR Analyse oder ein *Screening* veränderter mRNA Expression könnte weiteren Aufschluss und Erklärungen für die beobachteten Phänotypen bieten.

Math-1 ist während der Entwicklung des Cerebellums im Kleinhirn aktiv und im EGL bis P7-10 nachweisbar (Ben-Arie *et al.*, 1996; Schuller *et al.*, 2008). In einer Math-1 defizienten Maus wird das EGL im Cerebellum nicht ausgebildet und die Gyrifizierung fehlt (Ben-Arie *et al.*, 1997). Ulrich Schüller verwendete eine Math-1 Cre Maus, um SmoM2 getriebene Medulloblastome zu erzeugen (Schuller *et al.*, 2008). Obwohl wir in Lsl-MYCN;Math1-Cre Tieren den *flox-out* der Polyadenyl-Stoppsequenz im Gehirn nachweisen konnten, konnten wir im Gegensatz zu Lsl-SmoM2;Math1-Cre Mäusen, die sehr früh in der Entwicklung Medulloblastome entwickeln (Schuller *et al.*, 2008), keine Unterschiede der Phänotypen zwischen doppelt-transgenen und wildtypischen Tieren beobachten.

Zusammengenommen lässt sich aus diesen Ergebnissen folgern, dass eine MYCN Expression in Medulloblastomvorläuferzellen nicht unmittelbar ausreichend ist, um Tumore hervorzurufen. Gründe dafür könnte das Zeitfenster der Expression sein (Phoenix und Gilbertson, 2012), oder fehlende, bisher unbekannte Cofaktoren. Wir können demnach festhalten, dass es bisher nicht gelungen ist, durch eine gezielte MYCN Expression die Genese MYCN-getriebener Medulloblastome im transgenen Mausmodell nachzustellen.

Eine Alternative zur Generierung MYCN getriebener, embryonaler Tumore wäre eine Aktivierung von MYCN unter der Kontrolle des Olig2 Promotors, durch eine Lsl-MYCN;Olig2-Cre Verpaarung. Olig2 ist ein Marker für Progenitorzellen in der rostralen Rhombischen Lippe und wird zwischen Embryonaltag 14,5 und 18,5 exprimiert (Schuller *et al.*, 2008). Schüller et al. kreierten eine Olig2-Cre Maus, die in Verpaarung mit der Lsl-SmoM2 Maus Medulloblastome hervorrief (Schuller *et al.*, 2008). Da Olig2 ebenfalls ein Marker für Glioblastomstammzellen (Trepant *et al.*, 2014), war diese Möglichkeit hier nicht einbezogen worden. In Anbetracht der hier vorgestellten Ergebnisse, bei denen wir MYCN gezielt in GFAP-, Nestin- und Math-1 positiven Zellen und Geweben exprimieren konnten, bleibt dies ein denkbarer Ansatz zur Modellierung von MYCN-getriebenen Hirntumoren.

5.3 GFAP-Cre getriebene Tumormodelle in der transgenen Maus

Zur Etablierung der Methode verpaarten wir zunächst eine SmoM2 Maus mit der GFAP-Cre Maus. Die von uns generierten Medulloblastome in SmoM2;GFAP-Cre Mäusen spiegeln die in Schüller et al. beschriebenen Ergebnisse der dort verwendeten SmoM2;GFAP-Cre Verpaarung (Schuller *et al.*, 2008).

5.3.1 Abdominale Tumore der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus lassen sich als murine Glukagonome beschreiben

In doppelt-transgenen Lsl-MYCN;GFAP-Cre Tieren entstanden abdominale Tumore, Hirntumore oder beide Tumore zur gleichen Zeit. Im Abdomen waren die Tumore im Pankreas lokalisiert. Obwohl in GFAP positiven Zellen neben MYCN auch Luciferase transkribiert wird, konnten die Tumore durch Luciferininjektion mittels *in vivo Imaging* nicht nachgewiesen werden, da lokale GFAP-Expression in der Haut mögliche Signale des Tumors überlagerte.

Im histologischen Bild waren die Tumore gut vaskularisiert, einkernig, ohne besondere mitotische Figuren und positiv für Chromogranin A. Eine genauere Betrachtung zeigte, dass sie den Langerhans'schen Inseln des exokrinen Pankreas entsprangen. Yang et al. stellten ein Zebrafisch-Modell vor, in dem durch gezielte MYCN Expression im Pankreas neuroendokrine Tumore hervorgerufen werden (Yang *et al.*, 2004). Diese Tumore gehen von pankreatischen β -Zellen aus, welche Insulin produzieren; die dort auftretenden Tumore sind demnach am ehesten mit humanen Insulinomen vergleichbar (Yang *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu gingen die Tumore der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus von α -Zellen des Pankreas aus, die GFAP exprimieren (Bertelli *et al.*, 2000; Regoli *et al.*, 2000). Die α -Zellen der Langerhans'schen Inseln produzieren Glukagon; Tumore die aus diesem Gewebe hervorgehen, werden als Glukagonome bezeichnet, da sie hohe Mengen an Glukagon produzieren. Sowohl im Plasma, als auch in den Tumoren der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Tiere ließ sich ein erhöhter Wert von Glukagon feststellen. Patienten, die an einem Glukagonom leiden, zeigen häufig eine nekrolytische Dermatitis (Wilkinson, 1971). Das Fell tumortragende Mäuse war in einem sehr schlechten Zustand, was auf eventuelle Hautprobleme zurückzuführen sein könnte. Tumore der Inselzellen des Pankreas gehen oft mit MEN 1 (Multiple endokrine Neoplasie Typ 1) einher, in der neben Pankreastumoren oft Tumore der Nebenschilddrüse oder anterioren Hypophyse auftreten (Lemmens *et al.*, 1997).

Die Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäuse entwickelten keine Veränderungen in der Nebenschilddrüse, wiesen jedoch Hypophysentumore auf, was darauf hindeutet, dass einige Tiere an einem MEN1 Syndrom leiden könnten. Der MEN1 Lokus liegt beim Menschen auf Chromosom 11q13 (Larsson *et al.*, 1988). Bei aCGH Analysen konnten wir keine Chromosomen-Aberrationen feststellen, die auf eine Veränderung in diesem Chromosomenbereich der Maus hindeuten und auch in der Microarray Analyse zeigte sich keine veränderte Expression des MEN1 Gens. Obwohl die Primärtumore der Mäuse sehr langsam wuchsen, proliferierten die aus den Mäusen gewonnenen Tumorzelllinien Pank 4, IC11 und IID2 *in vitro* sehr schnell und führten auch in Xenografts zu schnell wachsenden Tumoren. Die gewonnenen Zelllinien ließen sich *in vitro* mit den MYCN Inhibitoren JQ1 und MLN 8237 behandeln und in ihrem Wachstum hemmen. Überraschenderweise reagierten IID2 Xeno Zellen signifikant resistenter auf die Inhibitoren als die IID2 Zelllinie. Auch im Hinblick auf diese Entwicklung wäre eine Untersuchung chromosomaler Aberrationen erstrebenswert. Generell zeigten die Zelllinien Pank4, IC11 und IID2 unterschiedliche IC50s für JQ1 bzw. MLN 8237. Xenografts der Pank 4 Zelllinie reagierten mit erhöhten Apoptoseraten und verlangsamter Proliferation auf die Behandlung mit JQ1 und MLN 8237. Vergleichbare Ergebnisse wurden in Arbeiten von Kristina Althoff im Neuroblastom und Anton Henssen im Medulloblastom publiziert (Althoff *et al.*, 2014; Henssen *et al.*, 2013). Mit JQ1 behandelte Medulloblastomzellen und –xenografts wachsen signifikant langsamer und zeigen signifikant niedrigere Anteile proliferativer bzw. höhere Anteile apoptotischer Zellen (Henssen *et al.*, 2013). Neuroblastomzellen wurden *in vitro* mit JQ1 bzw. MLN 8237 behandelt, Xenografts nur mit JQ1. Beide Behandlungen verringerten die Proliferation und erhöhten die Apoptose (Althoff *et al.*, 2014). Zusammengenommen lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass sich durch die indirekte MYCN Inhibition mit Bromodomänen- oder Aurorakinase-Inhibitoren, das Tumorwachstum MYCN-abhängiger Tumore unabhängig von der Tumorentität hemmen lässt.

5.3.2 Hirntumore der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäuse ähneln humanen Hypophysenadenomen

Die Tumore im Gehirn der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäuse entwickelten sich aus der Adenohypophyse. Histologisch zeigten die Tumore dichte, Chromogranin A positive Zellen. Am ehesten ließ sich die Tumore mit humanen Hypophysenadenomen vergleichen. Das Hypophysenadenom ist der häufigste Tumor des zentralen Nervensystems und diese machen

etwa 10% der primären intracraniellen Tumore aus (CBTRUS, 1997). Im Hypophysenadenom kommt es zu einer hohen CyclinD1 Expression, was in 25% der Tumore zu einer allelischen Imbalanz führt (Hibberts *et al.*, 1999).

Hypophysenadenome werden, meist in Verbindung mit Adenomen der Nebenschilddrüse und pankreatischen Inselzelltumoren, mit der multiplen endokrinen Neoplasien Typ I (MEN1) in Verbindung gebracht. 90% der im Rahmen von MEN1 entstehenden Hypophysenadenome sind Prolaktinome, die sich unter anderem durch hohe Prolaktinspiegel im Blut auszeichnen (Capella *et al.*, 1995). Microarray-Analysen der Hypophysentumore der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäuse zeigten eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von Prolaktin. Die Prolaktin-Expression, sowie die Tatsache, dass einige der Tiere simultane Hypophysen- und Pankreastumore entwickeln, sind demnach Anhaltspunkte für das Vorliegen eines MEN1 Syndroms, wenngleich wir keine Adenome in der Nebenschilddrüse detektieren konnten. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu zeigen ob das Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mausmodell neben MYCN getriebenen Glukagonomen und Hypophysenadenomen auch ein Modell für das MEN1 Syndrom ist.

5.3.3 Relevanz des Lsl-MYCN;GFAP-Cre Modells

Wir konnten in diesem Mausmodell zeigen, dass eine gerichtete Expression des Onkogens MYCN in GFAP-Cre positiven Zellen im Pankreas und in der Hypophyse Tumore hervorrufen kann. Dabei muss kritisch betrachtet werden, dass bisher eine MYCN Expression in pankreatischen Tumoren nicht beschrieben wurde. Allerdings zeigen viele pankreatische Tumore, wie zum Beispiel das duktales Adenokarzinom des Pankreas c-MYC Überexpressionen und Amplifikationen (Skoudy *et al.*, 2011). Sowohl in der Tumorentwicklung als auch in gezielten *knock-in* Modellen wurde bereits gezeigt, dass MYCN die Funktion von c-MYC übernehmen kann (Rustgi *et al.*, 1991). Des Weiteren werden c-MYC oder MYCN häufig komplementär, aber nicht simultan exprimiert. Ein Beispiel hierfür ist der Subtyp vier der Medulloblastome (Taylor *et al.*, 2012).

Um nachzuweisen, dass die Tumorzellen Onkogen-abhängig wachsen, wurden Pank4 Xenografts mit JQ1 bzw. MLN 8237 behandelt. Behandelte Tiere zeigten eine signifikant langsamere Tumorentwicklung als Kontrollen. Zusammen mit den aus Henssen *et al.*, 2013 und Althoff *et al.*, 2014 gewonnenen Informationen über JQ1 und/oder MLN 8237 vermittelte Inhibition von MYCN im Neuroblastom (Althoff *et al.*, 2014) und Medulloblastom (Henssen

et al., 2013), können wir daraus folgern, dass die Inhibition von MYCN und damit die Inhibition der Tumorprogression unabhängig der Tumorentität durchführbar ist. Dies ist ein starker Hinweis darauf, dass MYCN nicht nur für die Initiation des Tumors, sondern auch für die Aufrechterhaltung des malignen Phänotyps eine wichtige Rolle spielt. Diese Befunde haben wichtige Konsequenzen für die Wahl gerichteter Therapien. So haben Untersuchungen zu aktivierenden Mutationen in der anaplastischen Lymphomkinase (ALK), die mit schlechter Prognose im Neuroblastom (De Brouwer *et al.*, 2010) und im Lungenkarzinom (Soda *et al.*, 2007) assoziiert wurden, eine Abhängigkeit des Tumorwachstums von der ALK-Aktivität nachgewiesen. Crizotinib, ein niedermolekularer ALK-Inhibitor, wird konsequenterweise zur Behandlung des Bronchialkarzinoms und von Neuroblastompatienten angewandt. Eine entsprechende Rolle für die MYCN-Inhibition in MYCN-abhängig wachsenden Tumoren bedarf weiterer Untersuchungen.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Das Ziel dieser Dissertation war, MYCN abhängige und –unabhängige Prozesse im Rahmen von Tumorentstehung und Tumorthherapie *in vitro* und *in vivo* zu modellieren.

Beim Neuroblastom, dem häufigsten soliden, extrakraniellen Tumor des Kindesalters, ist im Rahmen von Tumorentstehung und Tumorthherapie, in 20% der Tumore eine Amplifikation des Onkogens MYCN beschrieben. MYCN Amplifikation ist mit aggressivem Tumorwachstum und einer schlechten Prognose für den Patienten assoziiert. Bei normalem MYCN Status ist eine Risikoeinschätzung schwierig. Analysen von mRNA Profilen primärer Neuroblastome führten in dieser Arbeit zur Identifikation von JARID1C als MYCN unabhängigen prognostischen Marker. JARID1C ist eine Histondemethylase, welche tri- und dimethyliertes H3K4 erkennt und die Methylreste entfernt. In allen getesteten Neuroblastomzelllinien führte eine Inhibition der JARID1C Funktion zu einem Anstieg apoptotischer und dem Abfall proliferativer Zellen. Hierzu wurde JARID1C-spezifische siRNA, und Pbit, einen kürzlich identifizierten JARID1C Inhibitor eingesetzt. Die JARID1C Expression wurde als essentiell für das Überleben von Neuroblastomzellen unabhängig vom MYCN Status nachgewiesen.

Durch die Kreuzung transgener Mäuse mit konditional aktivierbarem MYCN (Lsl-MYCN) und Mäusen, die gewebespezifisch die Cre-Rekombinase exprimieren, wurde MYCN gezielt in diesen Zellen herauf reguliert. In doppelt-transgenen GFAP-Cre;Lsl-MYCN Mäusen kam es zu einer konditionaler Überexpression von MYCN in pankreatischen α -Zellen, wodurch sich Glukagonome entwickelten. Neben Glukagonomen bildeten einige Tiere auch Hypophysenadenome aus. Tiere mit pankreatischen Tumoren zeigten eine positive Glukagonreaktion im Tumorgewebe sowie erhöhte Werte von Plasma-Glukagon, während Insulinwerte unverändert blieben. Die Tumore zeigten keine chromosomalen Aberrationen und wenige signifikant auf mRNA Ebene regulierte Gene. Aus einem Glukagonom wurden Zelllinien etabliert, die auf eine MYCN Inhibition durch den Brd4 Inhibitor JQ1 und den Aurorakinase A Inhibitor MLN 8237 sensibel reagierten. Das Tumorwachstum von Xenografts dieser Zellen wurde durch beide Inhibitoren signifikant reduziert. Serielle Transplantationen dieser Zelllinien führten zu einer erhöhten Resistenz gegen MYCN-gerichtete Therapien. Somit wurde in dieser Arbeit erstmals ein transgenes Modell für Glukagonome und Hypophysenadenome entwickelt. Neben dem Einsatz zur Überprüfung MYCN-gerichteter Therapien kann dieses Tiermodell auch zur Untersuchung der Biologie neuroendokriner Tumore genutzt werden.

7. Abstract

This thesis was aiming to model MYCN dependent and independent processes *in vitro* and *in vivo*.

In neuroblastoma, the most common, extracranial childhood malignancy, the oncogene MYCN is amplified in 20% of tumors. MYCN Amplification is associated with aggressive progression and poor outcome. Risk assessment in patients with normal MYCN status remains difficult. Analyses of mRNA expression profiles from primary neuroblastomas resulted in the identification of JARID1C as a prognostic marker for aggressive neuroblastoma independent of the MYCN amplification status. JARID1C is a histone demethylase, detecting and removing trimethyl and dimethyl residues of lysines at the position 4 of histone 3 (H3K4). The JARID1C expression is essential for neuroblastoma cell survival. An inhibition of JARID1C resulted in an increased fraction of apoptotic cells and a decreased number of proliferative cells in all cell lines tested. For the inhibition of JARID1C function, JARID1C specific siRNA and Pbit, a recently discovered small-molecule inhibitor, was applied.

Cross-breeding of transgenic mice with conditional expression of MYCN (Lsl-MYCN) with mice expressing tissue-specific Cre recombinase, MYCN was upregulated in these cells. In double-transgenic GFAP-Cre;Lsl-NMYC mice, this led to a conditional overexpression of MYCN in pancreatic α -cells, resulting in the development of glucagonoma. Apart from glucagonoma, some animals developed pituitary adenoma. Animals with pancreatic tumors showed a positive reaction for glucagon in tumor tissue and increased levels of blood glucagon, while insulin levels remained unchanged. The tumors showed only a few significantly regulated mRNAs and no chromosomal aberrations.

Cell lines established from a glucagonoma responded to targeted inhibition of MYCN using the Brd4 inhibitor JQ1 and the Aurora kinase A inhibitor MLN 8237. Growth of xenografted tumor cells was also significantly decreased upon inhibitor treatment, while serial transplantation induced resistance against JQ1 and MLN 8237. This thesis presents the first transgenic mouse model for glucagonoma and pituitary adenoma. Besides using the animal model for further investigations of MYCN-directed therapies, it may also foster the understanding of the biology of neuroendocrine tumors .

8. Literaturverzeichnis

- Althoff, K., Beckers, A., Bell, E., Nortmeyer, M., Thor, T., Sprussel, A., Lindner, S., De Preter, K., Florin, A., Heukamp, L. C., Klein-Hitpass, L., Astrahantseff, K., Kumps, C., Speleman, F., Eggert, A., Westermann, F., Schramm, A. und Schulte, J. H. (2014) A Cre-conditional MYCN-driven neuroblastoma mouse model as an improved tool for preclinical studies. *Oncogene*.
- Althoff, K., Beckers, A., Odersky, A., Mestdagh, P., Koster, J., Bray, I. M., Bryan, K., Vandesompele, J., Speleman, F., Stallings, R. L., Schramm, A., Eggert, A., Sprussel, A. und Schulte, J. H. (2013) MiR-137 functions as a tumor suppressor in neuroblastoma by downregulating KDM1A. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 133, 1064-1073.
- An, S. und Song, J. J. (2011) The coded functions of noncoding RNAs for gene regulation. *Molecules and cells*, 31, 491-496.
- Apte, M. V., Haber, P. S., Applegate, T. L., Norton, I. D., McCaughan, G. W., Korsten, M. A., Pirola, R. C. und Wilson, J. S. (1998) Periacinar stellate shaped cells in rat pancreas: identification, isolation, and culture. *Gut*, 43, 128-133.
- Askew, D. S., Ashmun, R. A., Simmons, B. C. und Cleveland, J. L. (1991) Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*, 6, 1915-1922.
- Askew, D. S., Ihle, J. N. und Cleveland, J. L. (1993) Activation of apoptosis associated with enforced myc expression in myeloid progenitor cells is dominant to the suppression of apoptosis by interleukin-3 or erythropoietin. *Blood*, 82, 2079-2087.
- Bailey, P. und Cushing, H. (1925) Microchemical Color Reactions as an Aid to the Identification and Classification of Brain Tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 11, 82-84.
- Bale, S. J., Falk, R. T. und Rogers, G. R. (1998) Patching together the genetics of Gorlin syndrome. *Journal of cutaneous medicine and surgery*, 3, 31-34.
- Becker, S. K., D; Rothman, S. (1942) Cutaneous manifestations of internal malignant tumors. *Arch Dermatol Syph*, 45, 1069-1080.
- Beintema, J. J., Campagne, R. N. und Gruber, M. (1973) Rat pancreatic ribonuclease. I. Isolation and properties. *Biochimica et biophysica acta*, 310, 148-160.
- Ben-Arie, N., Bellen, H. J., Armstrong, D. L., McCall, A. E., Gordadze, P. R., Guo, Q., Matzuk, M. M. und Zoghbi, H. Y. (1997) Math1 is essential for genesis of cerebellar granule neurons. *Nature*, 390, 169-172.

- Ben-Arie, N., McCall, A. E., Berkman, S., Eichele, G., Bellen, H. J. und Zoghbi, H. Y. (1996) Evolutionary conservation of sequence and expression of the bHLH protein Atonal suggests a conserved role in neurogenesis. *Human molecular genetics*, 5, 1207-1216.
- Benard, J. (1995) Genetic alterations associated with metastatic dissemination and chemoresistance in neuroblastoma. *European journal of cancer*, 31A, 560-564.
- Berridge, M. V. und Tan, A. S. (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of biochemistry and biophysics*, 303, 474-482.
- Bertelli, E., Regoli, M., Gambelli, F., Lucattelli, M., Lungarella, G. und Bastianini, A. (2000) GFAP is expressed as a major soluble pool associated with glucagon secretory granules in A-cells of mouse pancreas. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 48, 1233-1242.
- Biedler, J. L., Roffler-Tarlov, S., Schachner, M. und Freedman, L. S. (1978) Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer research*, 38, 3751-3757.
- Bloom, S. R. und Polak, J. M. (1987) Glucagonoma syndrome. *The American journal of medicine*, 82, 25-36.
- Boden, G. (1989) Glucagonomas and insulinomas. *Gastroenterology clinics of North America*, 18, 831-845.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- Brockmann, M., Poon, E., Berry, T., Carstensen, A., Deubzer, H. E., Rycak, L., Jamin, Y., Thway, K., Robinson, S. P., Roels, F., Witt, O., Fischer, M., Chesler, L. und Eilers, M. (2013) Small molecule inhibitors of aurora-a induce proteasomal degradation of N-myc in childhood neuroblastoma. *Cancer cell*, 24, 75-89.
- Brodeur, G. M. (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature reviews. Cancer*, 3, 203-216.
- Brodeur, G. M., Pritchard, J., Berthold, F., Carlsen, N. L., Castel, V., Castelberry, R. P., De Bernardi, B., Evans, A. E., Favrot, M., Hedborg, F. und et al. (1993) Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 11, 1466-1477.

- Brodeur, G. M., Seeger, R. C., Schwab, M., Varmus, H. E. und Bishop, J. M. (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science*, 224, 1121-1124.
- Brugieres, L., Pierron, G., Chompret, A., Paillerets, B. B., Di Rocco, F., Varlet, P., Pierre-Kahn, A., Caron, O., Grill, J. und Delattre, O. (2010) Incomplete penetrance of the predisposition to medulloblastoma associated with germ-line SUFU mutations. *Journal of medical genetics*, 47, 142-144.
- Buniatian, G., Gebhardt, R., Schrenk, D. und Hamprecht, B. (1996) Colocalization of three types of intermediate filament proteins in perisinusoidal stellate cells: glial fibrillary acidic protein as a new cellular marker. *European journal of cell biology*, 70, 23-32.
- Capella, C., Riva, C., Leutner, M. und La Rosa, S. (1995) Pituitary lesions in multiple endocrine neoplasia syndrome (MENS) type 1. *Pathology, research and practice*, 191, 345-347.
- Casper, K. B., Jones, K. und McCarthy, K. D. (2007) Characterization of astrocyte-specific conditional knockouts. *Genesis*, 45, 292-299.
- CBTRUS (1997) Annual report: Central brain tumor registry of the United States.
- Chappell, J. und Dalton, S. (2013) Roles for MYC in the establishment and maintenance of pluripotency. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 3, a014381.
- Chen, H. L., Yuh, C. H. und Wu, K. K. (2010) Nestin is essential for zebrafish brain and eye development through control of progenitor cell apoptosis. *PloS one*, 5, e9318.
- Christensen, J., Agger, K., Cloos, P. A., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K. H., Salcini, A. E. und Helin, K. (2007) RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri-and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell*, 128, 1063-1076.
- Christopoulos, P. E. a. C. (2001) Glucagonoma. *Annals of Gastroenterology*, 14.
- Chu, T. H. N. (2002) Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *PNAS*, 99, 6567-6572
- Clifford, S. C., Lusher, M. E., Lindsey, J. C., Langdon, J. A., Gilbertson, R. J., Straughton, D. und Ellison, D. W. (2006) Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell cycle*, 5, 2666-2670.
- Dahlstrand, J., Lardelli, M. und Lendahl, U. (1995) Nestin mRNA expression correlates with the central nervous system progenitor cell state in many, but not all, regions of

- developing central nervous system. *Brain research. Developmental brain research*, 84, 109-129.
- Dalgliesh, G. L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., Butler, A., Davies, H., Edkins, S., Hardy, C., Latimer, C., Teague, J., Andrews, J., Barthorpe, S., Beare, D., Buck, G., Campbell, P. J., Forbes, S., Jia, M., Jones, D., Knott, H., Kok, C. Y., Lau, K. W., Leroy, C., Lin, M. L., McBride, D. J., Maddison, M., Maguire, S., McLay, K., Menzies, A., Mironenko, T., Mulderrig, L., Mudie, L., O'Meara, S., Pleasance, E., Rajasingham, A., Shepherd, R., Smith, R., Stebbings, L., Stephens, P., Tang, G., Tarpey, P. S., Turrell, K., Dykema, K. J., Khoo, S. K., Petillo, D., Wondergem, B., Anema, J., Kahnoski, R. J., Teh, B. T., Stratton, M. R. und Futreal, P. A. (2010) Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature*, 463, 360-363.
- Dang, C. V. (1999) c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. *Molecular and cellular biology*, 19, 1-11.
- Danielyan, L., Tolstonog, G., Traub, P., Salvetter, J., Gleiter, C. H., Reisig, D., Gebhardt, R. und Buniatian, G. H. (2007) Colocalization of glial fibrillary acidic protein, metallothionein, and MHC II in human, rat, NOD/SCID, and nude mouse skin keratinocytes and fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology*, 127, 555-563.
- De Brouwer, S., De Preter, K., Kumps, C., Zabrocki, P., Porcu, M., Westerhout, E. M., Lakeman, A., Vandesompele, J., Hoebeeck, J., Van Maerken, T., De Paepe, A., Laureys, G., Schulte, J. H., Schramm, A., Van Den Broecke, C., Vermeulen, J., Van Roy, N., Beiske, K., Renard, M., Noguera, R., Delattre, O., Janoueix-Lerosey, I., Kogner, P., Martinsson, T., Nakagawara, A., Ohira, M., Caron, H., Eggert, A., Cools, J., Versteeg, R. und Speleman, F. (2010) Meta-analysis of neuroblastomas reveals a skewed ALK mutation spectrum in tumors with MYCN amplification. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 16, 4353-4362.
- De Giorgio, R., Migliori, M., Lalli, S., Montini, G. C., Gullo, L., Corinaldesi, R., Bordi, C. und Tomassetti, P. (1998) Asymptomatic glucagonoma presenting with an isolated hepatic nodule. *Hepato-gastroenterology*, 45, 1093-1096.
- Delmore, J. E., Issa, G. C., Lemieux, M. E., Rahl, P. B., Shi, J., Jacobs, H. M., Kastiris, E., Gilpatrick, T., Paranal, R. M., Qi, J., Chesi, M., Schinzel, A. C., McKeown, M. R., Heffernan, T. P., Vakoc, C. R., Bergsagel, P. L., Ghobrial, I. M., Richardson, P. G., Young, R. A., Hahn, W. C., Anderson, K. C., Kung, A. L., Bradner, J. E. und

- Mitsiades, C. S. (2011) BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. *Cell*, 146, 904-917.
- Dewitt, J., Ochoa, V., Urschitz, J., Elston, M., Moisyadi, S. und Nishi, R. (2014) Constitutively active TrkB confers an aggressive transformed phenotype to a neural crest-derived cell line. *Oncogene*, 33, 977-985.
- Dezfouli, S., Bakke, A., Huang, J., Wynshaw-Boris, A. und Hurlin, P. J. (2006) Inflammatory disease and lymphomagenesis caused by deletion of the Myc antagonist Mnt in T cells. *Molecular and cellular biology*, 26, 2080-2092.
- Diederichs, S. (2010) [Non-coding RNA in malignant tumors. A new world of tumor biomarkers and target structures in cancer cells]. *Der Pathologe*, 31 Suppl 2, 258-262.
- Dong, Y., Liang, G., Yuan, B., Yang, C., Gao, R. und Zhou, X. (2014) MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of osteosarcoma cells by activating the PI3K/Akt pathway. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
- Dou, D., Alex, D., Du, B., Tiew, K. C., Aravapalli, S., Mandadapu, S. R., Calderone, R. und Groutas, W. C. (2011) Antifungal activity of a series of 1,2-benzisothiazol-3(2H)-one derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 19, 5782-5787.
- Dubuc, A. M., Northcott, P. A., Kenney, A. M. und Taylor, M. D. (2010) Calculating a cure for cancer: managing medulloblastoma MATH1-ematically. *Expert review of neurotherapeutics*, 10, 1489-1492.
- Eisenman, R. N. (2001) Deconstructing myc. *Genes & development*, 15, 2023-2030.
- Eng, L. F., Ghirnikar, R. S. und Lee, Y. L. (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochemical research*, 25, 1439-1451.
- Eschenburg, G., Eggert, A., Schramm, A., Lode, H. N. und Hundsdoerfer, P. (2012) Smac mimetic LBW242 sensitizes XIAP-overexpressing neuroblastoma cells for TNF-alpha-independent apoptosis. *Cancer research*, 72, 2645-2656.
- Esni, F., Stoffers, D. A., Takeuchi, T. und Leach, S. D. (2004) Origin of exocrine pancreatic cells from nestin-positive precursors in developing mouse pancreas. *Mechanisms of development*, 121, 15-25.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z. und Hancock, D. C. (1992) Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69, 119-128.
- Facchini, L. M. und Penn, L. Z. (1998) The molecular role of Myc in growth and transformation: recent discoveries lead to new insights. *FASEB journal : official*

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 12, 633-651.
- Feder, M. K. und Gilbert, F. (1983) Clonal evolution in a human neuroblastoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 70, 1051-1056.
- Filippakopoulos, P., Qi, J., Picaud, S., Shen, Y., Smith, W. B., Fedorov, O., Morse, E. M., Keates, T., Hickman, T. T., Felletar, I., Philpott, M., Munro, S., McKeown, M. R., Wang, Y., Christie, A. L., West, N., Cameron, M. J., Schwartz, B., Heightman, T. D., La Thangue, N., French, C. A., Wiest, O., Kung, A. L., Knapp, S. und Bradner, J. E. (2010) Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature*, 468, 1067-1073.
- Flora, A., Klisch, T. J., Schuster, G. und Zoghbi, H. Y. (2009) Deletion of *Atoh1* disrupts Sonic Hedgehog signaling in the developing cerebellum and prevents medulloblastoma. *Science*, 326, 1424-1427.
- Frankton, S. und Bloom, S. R. (1996) Gastrointestinal endocrine tumours. Glucagonomas. *Bailliere's clinical gastroenterology*, 10, 697-705.
- Gard, A. L., White, F. P. und Dutton, G. R. (1985) Extra-neural glial fibrillary acidic protein (GFAP) immunoreactivity in perisinusoidal stellate cells of rat liver. *Journal of neuroimmunology*, 8, 359-375.
- Gibson, P., Tong, Y., Robinson, G., Thompson, M. C., Curre, D. S., Eden, C., Kranenburg, T. A., Hogg, T., Poppleton, H., Martin, J., Finkelstein, D., Pounds, S., Weiss, A., Patay, Z., Scoggins, M., Ogg, R., Pei, Y., Yang, Z. J., Brun, S., Lee, Y., Zindy, F., Lindsey, J. C., Taketo, M. M., Boop, F. A., Sanford, R. A., Gajjar, A., Clifford, S. C., Roussel, M. F., McKinnon, P. J., Gutmann, D. H., Ellison, D. W., Wechsler-Reya, R. und Gilbertson, R. J. (2010) Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*, 468, 1095-1099.
- Gilbertson, R. J. und Ellison, D. W. (2008) The origins of medulloblastoma subtypes. *Annual review of pathology*, 3, 341-365.
- Gleeson, M. H., Bloom, S. R., Polak, J. M., Henry, K. und Dowling, R. H. (1971) Endocrine tumour in kidney affecting small bowel structure, motility, and absorptive function. *Gut*, 12, 773-782.
- Han, X., Gui, B., Xiong, C., Zhao, L., Liang, J., Sun, L., Yang, X., Yu, W., Si, W., Yan, R., Yi, X., Zhang, D., Li, W., Li, L., Yang, J., Wang, Y., Sun, Y. E., Zhang, D., Meng, A. und Shang, Y. (2014) Destabilizing LSD1 by Jade-2 promotes neurogenesis: an antibraking system in neural development. *Molecular cell*, 55, 482-494.

- Hatten, M. E. und Roussel, M. F. (2011) Development and cancer of the cerebellum. *Trends in neurosciences*, 34, 134-142.
- Hatton, B. A., Villavicencio, E. H., Tsuchiya, K. D., Pritchard, J. I., Ditzler, S., Pullar, B., Hansen, S., Knoblaugh, S. E., Lee, D., Eberhart, C. G., Hallahan, A. R. und Olson, J. M. (2008) The Smo/Smo model: hedgehog-induced medulloblastoma with 90% incidence and leptomeningeal spread. *Cancer research*, 68, 1768-1776.
- Hayami, S., Yoshimatsu, M., Veerakumarasivam, A., Unoki, M., Iwai, Y., Tsunoda, T., Field, H. I., Kelly, J. D., Neal, D. E., Yamaue, H., Ponder, B. A., Nakamura, Y. und Hamamoto, R. (2010) Overexpression of the JmjC histone demethylase KDM5B in human carcinogenesis: involvement in the proliferation of cancer cells through the E2F/RB pathway. *Molecular cancer*, 9, 59.
- Henssen, A., Thor, T., Odersky, A., Heukamp, L., El-Hindy, N., Beckers, A., Speleman, F., Althoff, K., Schafer, S., Schramm, A., Sure, U., Fleischhack, G., Eggert, A. und Schulte, J. H. (2013) BET bromodomain protein inhibition is a therapeutic option for medulloblastoma. *Oncotarget*, 4, 2080-2095.
- Hibberts, N. A., Simpson, D. J., Bicknell, J. E., Broome, J. C., Hoban, P. R., Clayton, R. N. und Farrell, W. E. (1999) Analysis of cyclin D1 (CCND1) allelic imbalance and overexpression in sporadic human pituitary tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 5, 2133-2139.
- Hidalgo, A., Baudis, M., Petersen, I., Arreola, H., Pina, P., Vazquez-Ortiz, G., Hernandez, D., Gonzalez, J., Lazos, M., Lopez, R., Perez, C., Garcia, J., Vazquez, K., Alatorre, B. und Salcedo, M. (2005) Microarray comparative genomic hybridization detection of chromosomal imbalances in uterine cervix carcinoma. *BMC cancer*, 5, 77.
- Ho, R., Eggert, A., Hishiki, T., Minturn, J. E., Ikegaki, N., Foster, P., Camoratto, A. M., Evans, A. E. und Brodeur, G. M. (2002) Resistance to chemotherapy mediated by TrkB in neuroblastomas. *Cancer research*, 62, 6462-6466.
- Huang, J., Sengupta, R., Espejo, A. B., Lee, M. G., Dorsey, J. A., Richter, M., Opravil, S., Shiekhata, R., Bedford, M. T., Jenuwein, T. und Berger, S. L. (2007) p53 is regulated by the lysine demethylase LSD1. *Nature*, 449, 105-108.
- Hunstein, W., Trumper, L. H., Dummer, R. und Schwechheimer, K. (1988) Glucagonoma syndrome and bronchial carcinoma. *Annals of internal medicine*, 109, 920-921.
- Iraci, N., Diolaiti, D., Papa, A., Porro, A., Valli, E., Gherardi, S., Herold, S., Eilers, M., Bernardoni, R., Della Valle, G. und Perini, G. (2011) A SP1/MIZ1/MYCN repression complex recruits HDAC1 at the TRKA and p75NTR promoters and affects

- neuroblastoma malignancy by inhibiting the cell response to NGF. *Cancer research*, 71, 404-412.
- Iwase, S., Lan, F., Bayliss, P., de la Torre-Ubieta, L., Huarte, M., Qi, H. H., Whetstine, J. R., Bonni, A., Roberts, T. M. und Shi, Y. (2007) The X-linked mental retardation gene *SMCX/JARID1C* defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell*, 128, 1077-1088.
- Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G. und Delattre, O. (2010) Molecular pathogenesis of peripheral neuroblastic tumors. *Oncogene*, 29, 1566-1579.
- Jarman, A. P., Grau, Y., Jan, L. Y. und Jan, Y. N. (1993) atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell*, 73, 1307-1321.
- Jensen, L. R., Amende, M., Gurok, U., Moser, B., Gimmel, V., Tzschach, A., Janecke, A. R., Tariverdian, G., Chelly, J., Fryns, J. P., Van Esch, H., Kleefstra, T., Hamel, B., Moraine, C., Gecz, J., Turner, G., Reinhardt, R., Kalscheuer, V. M., Ropers, H. H. und Lenzner, S. (2005) Mutations in the *JARID1C* gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. *American journal of human genetics*, 76, 227-236.
- Jessen, K. R. und Mirsky, R. (1980) Glial cells in the enteric nervous system contain glial fibrillary acidic protein. *Nature*, 286, 736-737.
- Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Boing, S., Metzger, R., Schneider, P. M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., Thomas, M., Berdel, W. E., Serve, H. und Muller-Tidow, C. (2003) MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 22, 8031-8041.
- Juin, P., Hueber, A. O., Littlewood, T. und Evan, G. (1999) c-Myc-induced sensitization to apoptosis is mediated through cytochrome c release. *Genes & development*, 13, 1367-1381.
- Kagaya, S., Kitanaka, C., Noguchi, K., Mochizuki, T., Sugiyama, A., Asai, A., Yasuhara, N., Eguchi, Y., Tsujimoto, Y. und Kuchino, Y. (1997) A functional role for death proteases in s-Myc- and c-Myc-mediated apoptosis. *Molecular and cellular biology*, 17, 6736-6745.
- Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F. und Pinkel, D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*, 258, 818-821.

- Kim, T. D., Shin, S. und Janknecht, R. (2008) Repression of Smad3 activity by histone demethylase SMCX/JARID1C. *Biochemical and biophysical research communications*, 366, 563-567.
- Klose, R. J., Kallin, E. M. und Zhang, Y. (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nature reviews. Genetics*, 7, 715-727.
- Knoepfler, P. S., Cheng, P. F. und Eisenman, R. N. (2002) N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes & development*, 16, 2699-2712.
- Kohl, N. E., Kanda, N., Schreck, R. R., Bruns, G., Latt, S. A., Gilbert, F. und Alt, F. W. (1983) Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. *Cell*, 35, 359-367.
- Kumps, C., Fieuw, A., Mestdagh, P., Menten, B., Lefever, S., Pattyn, F., De Brouwer, S., Sante, T., Schulte, J. H., Schramm, A., Van Roy, N., Van Maerken, T., Noguera, R., Combaret, V., Devalck, C., Westermann, F., Laureys, G., Eggert, A., Vandesompele, J., De Preter, K. und Speleman, F. (2013) Focal DNA copy number changes in neuroblastoma target MYCN regulated genes. *PloS one*, 8, e52321.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lardon, J., Roodman, I. und Bouwens, L. (2002) Nestin expression in pancreatic stellate cells and angiogenic endothelial cells. *Histochemistry and cell biology*, 117, 535-540.
- Larsson, C., Skogseid, B., Oberg, K., Nakamura, Y. und Nordenskjold, M. (1988) Multiple endocrine neoplasia type 1 gene maps to chromosome 11 and is lost in insulinoma. *Nature*, 332, 85-87.
- Lee, S., Rahnenfuhrer, J., Lang, M., De Preter, K., Mestdagh, P., Koster, J., Versteeg, R., Stallings, R. L., Varesio, L., Asgharzadeh, S., Schulte, J. H., Fielitz, K., Schwermer, M., Morik, K. und Schramm, A. (2014) Robust selection of cancer survival signatures from high-throughput genomic data using two-fold subsampling. *PloS one*, 9, e108818.
- Lemmens, I., Van de Ven, W. J., Kas, K., Zhang, C. X., Giraud, S., Wautot, V., Buisson, N., De Witte, K., Salandre, J., Lenoir, G., Pugeat, M., Calender, A., Parente, F., Quincey, D., Gaudray, P., De Wit, M. J., Lips, C. J., Hoppener, J. W., Khodaei, S., Grant, A. L., Weber, G., Kytola, S., Teh, B. T., Farnebo, F., Thakker, R. V. und et al. (1997) Identification of the multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) gene. The European Consortium on MEN1. *Human molecular genetics*, 6, 1177-1183.

- Lendahl, U., Zimmerman, L. B. und McKay, R. D. (1990) CNS stem cells express a new class of intermediate filament protein. *Cell*, 60, 585-595.
- Li, P., Du, F., Yuelling, L. W., Lin, T., Muradimova, R. E., Tricarico, R., Wang, J., Enikolopov, G., Bellacosa, A., Wechsler-Reya, R. J. und Yang, Z. J. (2013) A population of Nestin-expressing progenitors in the cerebellum exhibits increased tumorigenicity. *Nature neuroscience*, 16, 1737-1744.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lu, P. J., Sundquist, K., Baeckstrom, D., Poulsom, R., Hanby, A., Meier-Ewert, S., Jones, T., Mitchell, M., Pitha-Rowe, P., Freemont, P. und Taylor-Papadimitriou, J. (1999) A novel gene (PLU-1) containing highly conserved putative DNA/chromatin binding motifs is specifically up-regulated in breast cancer. *The Journal of biological chemistry*, 274, 15633-15645.
- Marchand, F. (1891) Beiträge zur Kenntniss der normalen und pathologischen Anatomie der Glandula carotica und der Nebennieren. In *Festschrift für Rudolph*, Vol. 5 *Virchows Arch.*, pp. 578.
- Maris, J. M., Hogarty, M. D., Bagatell, R. und Cohn, S. L. (2007) Neuroblastoma. *Lancet*, 369, 2106-2120.
- Maris, J. M. und Matthay, K. K. (1999) Molecular biology of neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17, 2264-2279.
- Martin, C. und Zhang, Y. (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 6, 838-849.
- Matei, V., Pauley, S., Kaing, S., Rowitch, D., Beisel, K. W., Morris, K., Feng, F., Jones, K., Lee, J. und Fritzsche, B. (2005) Smaller inner ear sensory epithelia in Neurog 1 null mice are related to earlier hair cell cycle exit. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 234, 633-650.
- McGavran, M. H., Unger, R. H., Recant, L., Polk, H. C., Kilo, C. und Levin, M. E. (1966) A glucagon-secreting alpha-cell carcinoma of the pancreas. *The New England journal of medicine*, 274, 1408-1413.
- Meitar, D., Crawford, S. E., Rademaker, A. W. und Cohn, S. L. (1996) Tumor angiogenesis correlates with metastatic disease, N-myc amplification, and poor outcome in human

- neuroblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 14, 405-414.
- Miettinen, M., Virtanen, I. und Talerman, A. (1985) Intermediate filament proteins in human testis and testicular germ-cell tumors. *The American journal of pathology*, 120, 402-410.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
- Mozell, E., Stenzel, P., Woltering, E. A., Rosch, J. und O'Dorisio, T. M. (1990) Functional endocrine tumors of the pancreas: clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Current problems in surgery*, 27, 301-386.
- Niu, X., Zhang, T., Liao, L., Zhou, L., Lindner, D. J., Zhou, M., Rini, B., Yan, Q. und Yang, H. (2012) The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein regulates gene expression and tumor growth through histone demethylase JARID1C. *Oncogene*, 31, 776-786.
- Northcott, P. A., Nakahara, Y., Wu, X., Feuk, L., Ellison, D. W., Croul, S., Mack, S., Kongkham, P. N., Peacock, J., Dubuc, A., Ra, Y. S., Zilberberg, K., McLeod, J., Scherer, S. W., Sunil Rao, J., Eberhart, C. G., Grajkowska, W., Gillespie, Y., Lach, B., Grundy, R., Pollack, I. F., Hamilton, R. L., Van Meter, T., Carlotti, C. G., Boop, F., Bigner, D., Gilbertson, R. J., Rutka, J. T. und Taylor, M. D. (2009) Multiple recurrent genetic events converge on control of histone lysine methylation in medulloblastoma. *Nature genetics*, 41, 465-472.
- Olshen, A. B., Venkatraman, E. S., Lucito, R. und Wigler, M. (2004) Circular binary segmentation for the analysis of array-based DNA copy number data. *Biostatistics*, 5, 557-572.
- Otto, T., Horn, S., Brockmann, M., Eilers, U., Schuttrumpf, L., Popov, N., Kenney, A. M., Schulte, J. H., Beijersbergen, R., Christiansen, H., Berwanger, B. und Eilers, M. (2009) Stabilization of N-Myc is a critical function of Aurora A in human neuroblastoma. *Cancer cell*, 15, 67-78.
- Pajtler, K. W., Weingarten, C., Thor, T., Kunkele, A., Heukamp, L. C., Buttner, R., Suzuki, T., Miyata, N., Grotzer, M., Rieb, A., Sprussel, A., Eggert, A., Schramm, A. und Schulte, J. H. (2013) The KDM1A histone demethylase is a promising new target for the epigenetic therapy of medulloblastoma. *Acta neuropathologica communications*, 1, 19.

- Perinchery, G., Sasaki, M., Angan, A., Kumar, V., Carroll, P. und Dahiya, R. (2000) Deletion of Y-chromosome specific genes in human prostate cancer. *The Journal of urology*, 163, 1339-1342.
- Phoenix, T. N. und Gilbertson, R. J. (2012) There's a time and a place for MYCN. *Cancer cell*, 21, 593-595.
- Puissant, A., Frumm, S. M., Alexe, G., Bassil, C. F., Qi, J., Chanthery, Y. H., Nekritz, E. A., Zeid, R., Gustafson, W. C., Greninger, P., Garnett, M. J., McDermott, U., Benes, C. H., Kung, A. L., Weiss, W. A., Bradner, J. E. und Stegmaier, K. (2013) Targeting MYCN in neuroblastoma by BET bromodomain inhibition. *Cancer discovery*, 3, 308-323.
- Queva, C., McArthur, G. A., Ramos, L. S. und Eisenman, R. N. (1999) Dwarfism and dysregulated proliferation in mice overexpressing the MYC antagonist MAD1. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*, 10, 785-796.
- Rao, G., Pedone, C. A., Coffin, C. M., Holland, E. C. und Fults, D. W. (2003) c-Myc enhances sonic hedgehog-induced medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice. *Neoplasia*, 5, 198-204.
- Regoli, M., Orazioli, D., Gerli, R. und Bertelli, E. (2000) Glial fibrillary acidic protein (GFAP)-like immunoreactivity in rat endocrine pancreas. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 48, 259-266.
- Ries, L. A. G. S., M.A.; Gurney, J.G.; Linet, M.; Tamra, T.; Young, J.L.; Bunin, G.R. (1999) Cancer incidence and survival among children and adolescent: United States SEER Program 1975 - 1995.
- Roesch, A., Fukunaga-Kalabis, M., Schmidt, E. C., Zabierowski, S. E., Brafford, P. A., Vultur, A., Basu, D., Gimotty, P., Vogt, T. und Herlyn, M. (2010) A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell*, 141, 583-594.
- Roggli, V. L., Judge, D. M. und McGavran, M. H. (1979) Duodenal glucagonoma: a case report. *Human pathology*, 10, 350-353.
- Rustgi, A. K., Dyson, N. und Bernards, R. (1991) Amino-terminal domains of c-myc and N-myc proteins mediate binding to the retinoblastoma gene product. *Nature*, 352, 541-544.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- Salsano, E., Pollo, B., Eoli, M., Giordana, M. T. und Finocchiaro, G. (2004) Expression of MATH1, a marker of cerebellar granule cell progenitors, identifies different medulloblastoma sub-types. *Neuroscience letters*, 370, 180-185.
- Sauer, B. (1998) Inducible gene targeting in mice using the Cre/lox system. *Methods*, 14, 381-392.
- Sayegh, J., Cao, J., Zou, M. R., Morales, A., Blair, L. P., Norcia, M., Hoyer, D., Tackett, A. J., Merkel, J. S. und Yan, Q. (2013) Identification of small molecule inhibitors of Jumonji AT-rich interactive domain 1B (JARID1B) histone demethylase by a sensitive high throughput screen. *The Journal of biological chemistry*, 288, 9408-9417.
- Schilling, F. H., Spix, C., Berthold, F., Erttmann, R., Fehse, N., Hero, B., Klein, G., Sander, J., Schwarz, K., Treuner, J., Zorn, U. und Michaelis, J. (2002) Neuroblastoma screening at one year of age. *The New England journal of medicine*, 346, 1047-1053.
- Schowe, B. M., K. (2011) Fast-Ensembles of Minimum Redundancy Feature Selection. In *Ensembles in Machine Learning* Springer, pp. 75 - 95.
- Schuller, U., Heine, V. M., Mao, J., Kho, A. T., Dillon, A. K., Han, Y. G., Huillard, E., Sun, T., Ligon, A. H., Qian, Y., Ma, Q., Alvarez-Buylla, A., McMahon, A. P., Rowitch, D. H. und Ligon, K. L. (2008) Acquisition of granule neuron precursor identity is a critical determinant of progenitor cell competence to form Shh-induced medulloblastoma. *Cancer cell*, 14, 123-134.
- Schulte, J. H., Lim, S., Schramm, A., Friedrichs, N., Koster, J., Versteeg, R., Ora, I., Pajtler, K., Klein-Hitpass, L., Kuhfittig-Kulle, S., Metzger, E., Schule, R., Eggert, A., Buettner, R. und Kirfel, J. (2009) Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer research*, 69, 2065-2071.
- Schwab, M., Alitalo, K., Klempnauer, K. H., Varmus, H. E., Bishop, J. M., Gilbert, F., Brodeur, G., Goldstein, M. und Trent, J. (1983) Amplified DNA with limited homology to myc cellular oncogene is shared by human neuroblastoma cell lines and a neuroblastoma tumour. *Nature*, 305, 245-248.
- Schwab, M., Westermann, F., Hero, B. und Berthold, F. (2003) Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *The Lancet. Oncology*, 4, 472-480.

- Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A., Casero, R. A. und Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, 119, 941-953.
- Sjoberg, G., Jiang, W. Q., Ringertz, N. R., Lendahl, U. und Sejersen, T. (1994) Colocalization of nestin and vimentin/desmin in skeletal muscle cells demonstrated by three-dimensional fluorescence digital imaging microscopy. *Experimental cell research*, 214, 447-458.
- Sjostrom, S. K., Finn, G., Hahn, W. C., Rowitch, D. H. und Kenney, A. M. (2005) The Cdk1 complex plays a prime role in regulating N-myc phosphorylation and turnover in neural precursors. *Developmental cell*, 9, 327-338.
- Skoudy, A., Hernandez-Munoz, I. und Navarro, P. (2011) Pancreatic ductal adenocarcinoma and transcription factors: role of c-Myc. *Journal of gastrointestinal cancer*, 42, 76-84.
- Smith, J. A., White, E. A., Sowa, M. E., Powell, M. L., Ottinger, M., Harper, J. W. und Howley, P. M. (2010) Genome-wide siRNA screen identifies SMCX, EP400, and Brd4 as E2-dependent regulators of human papillomavirus oncogene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 3752-3757.
- Soda, M., Choi, Y. L., Enomoto, M., Takada, S., Yamashita, Y., Ishikawa, S., Fujiwara, S., Watanabe, H., Kurashina, K., Hatanaka, H., Bando, M., Ohno, S., Ishikawa, Y., Aburatani, H., Niki, T., Sohara, Y., Sugiyama, Y. und Mano, H. (2007) Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448, 561-566.
- Soga, J. und Yakuwa, Y. (1998) Glucagonomas/diabetico-dermatogenic syndrome (DDS): a statistical evaluation of 407 reported cases. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*, 5, 312-319.
- Stacpoole, P. W., Jaspan, J., Kasselberg, A. G., Halter, S. A., Polonsky, K., Gluck, F. W., Liljenquist, J. E. und Rabin, D. (1981) A familial glucagonoma syndrome: genetic, clinical and biochemical features. *The American journal of medicine*, 70, 1017-1026.
- Sun, X. Y. und An, J. (2004) Expression of nestin, an intermediate filament protein, in human fetal hepatic stem cells. *Di 1 jun yi da xue xue bao = Academic journal of the first medical college of PLA*, 24, 207-209.
- Sun, Y., Wu, J., Wu, S. H., Thakur, A., Bollig, A., Huang, Y. und Liao, D. J. (2009) Expression profile of microRNAs in c-Myc induced mouse mammary tumors. *Breast cancer research and treatment*, 118, 185-196.

- Swartling, F. J. (2012) Myc proteins in brain tumor development and maintenance. *Upsala journal of medical sciences*, 117, 122-131.
- Swartling, F. J., Grimmer, M. R., Hackett, C. S., Northcott, P. A., Fan, Q. W., Goldenberg, D. D., Lau, J., Masic, S., Nguyen, K., Yakovenko, S., Zhe, X. N., Gilmer, H. C., Collins, R., Nagaoka, M., Phillips, J. J., Jenkins, R. B., Tihan, T., Vandenberg, S. R., James, C. D., Tanaka, K., Taylor, M. D., Weiss, W. A. und Chesler, L. (2010) Pleiotropic role for MYCN in medulloblastoma. *Genes & development*, 24, 1059-1072.
- Tahiliani, M., Mei, P., Fang, R., Leonor, T., Rutenberg, M., Shimizu, F., Li, J., Rao, A. und Shi, Y. (2007) The histone H3K4 demethylase SMCX links REST target genes to X-linked mental retardation. *Nature*, 447, 601-605.
- Taylor, M. D., Northcott, P. A., Korshunov, A., Remke, M., Cho, Y. J., Clifford, S. C., Eberhart, C. G., Parsons, D. W., Rutkowski, S., Gajjar, A., Ellison, D. W., Lichter, P., Gilbertson, R. J., Pomeroy, S. L., Kool, M. und Pfister, S. M. (2012) Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta neuropathologica*, 123, 465-472.
- Tee, A. E., Ling, D., Nelson, C., Atmadibrata, B., Dinger, M. E., Xu, N., Mizukami, T., Liu, P. Y., Liu, B., Cheung, B., Pasquier, E., Haber, M., Norris, M. D., Suzuki, T., Marshall, G. M. und Liu, T. (2014) The histone demethylase JMJD1A induces cell migration and invasion by up-regulating the expression of the long noncoding RNA MALAT1. *Oncotarget*, 5, 1793-1804.
- Teranishi, N., Naito, Z., Ishiwata, T., Tanaka, N., Furukawa, K., Seya, T., Shinji, S. und Tajiri, T. (2007) Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. *International journal of oncology*, 30, 593-603.
- Trepant, A. L., Bouchart, C., Rorive, S., Sauvage, S., Decaestecker, C., Demetter, P. und Salmon, I. (2014) Identification of OLIG2 as the most specific glioblastoma stem cell marker starting from comparative analysis of data from similar DNA chip microarray platforms. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
- Treutelaar, M. K., Skidmore, J. M., Dias-Leme, C. L., Hara, M., Zhang, L., Simeone, D., Martin, D. M. und Burant, C. F. (2003) Nestin-lineage cells contribute to the microvasculature but not endocrine cells of the islet. *Diabetes*, 52, 2503-2512.
- Tsujimura, T., Makiishi-Shimobayashi, C., Lundkvist, J., Lendahl, U., Nakasho, K., Sugihara, A., Iwasaki, T., Mano, M., Yamada, N., Yamashita, K., Toyosaka, A. und Terada, N. (2001) Expression of the intermediate filament nestin in gastrointestinal stromal

- tumors and interstitial cells of Cajal. The American journal of pathology, 158, 817-823.
- Tumilowicz, J. J., Nichols, W. W., Cholon, J. J. und Greene, A. E. (1970) Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. Cancer research, 30, 2110-2118.
- Tzschach, A., Lenzner, S., Moser, B., Reinhardt, R., Chelly, J., Fryns, J. P., Kleefstra, T., Raynaud, M., Turner, G., Ropers, H. H., Kuss, A. und Jensen, L. R. (2006) Novel JARID1C/SMCX mutations in patients with X-linked mental retardation. Human mutation, 27, 389.
- Vermeulen, M., Mulder, K. W., Denissov, S., Pijnappel, W. W., van Schaik, F. M., Varier, R. A., Baltissen, M. P., Stunnenberg, H. G., Mann, M. und Timmers, H. T. (2007) Selective anchoring of TFIID to nucleosomes by trimethylation of histone H3 lysine 4. Cell, 131, 58-69.
- Virchow, R. (1864) Hyperplasie der Zirbel und der Nebenniere.
- Wang, X., Liu, Y., Shao, D., Qian, Z., Dong, Z., Sun, Y., Xing, X., Cheng, X., Du, H., Hu, Y., Li, Y., Li, L., Dong, B., Li, Z., Wu, A., Wu, X., Bu, Z., Zong, X., Zhu, G., Ji, Q., Wen, X. Z., Zhang, L. H. und Ji, J. F. (2015) Recurrent amplification of MYC and TNFRSF11B in 8q24 is associated with poor survival in patients with gastric cancer. Gastric cancer : official journal of the International Gastric Cancer Association and the Japanese Gastric Cancer Association.
- Warner, T. F., Block, M., Hafez, G. R., Mack, E., Lloyd, R. V. und Bloom, S. R. (1983) Glucagonomas. Ultrastructure and immunocytochemistry. Cancer, 51, 1091-1096.
- Weiss, W. A., Aldape, K., Mohapatra, G., Feuerstein, B. G. und Bishop, J. M. (1997) Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. The EMBO journal, 16, 2985-2995.
- Wilkinson, D. S. (1971) Necrolytic migratory erythema with pancreatic carcinoma. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 64, 1197-1198.
- Wright, J. H. (1910) Neurocytoma or Neuroblastoma, a Kind of Tumor Not Generally Recognized. The Journal of experimental medicine, 12, 556-561.
- Wu, S. Y. und Chiang, C. M. (2007) The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. The Journal of biological chemistry, 282, 13141-13145.
- Xiang, Y., Zhu, Z., Han, G., Ye, X., Xu, B., Peng, Z., Ma, Y., Yu, Y., Lin, H., Chen, A. P. und Chen, C. D. (2007) JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated

- in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 19226-19231.
- Xie, J., Murone, M., Luoh, S. M., Ryan, A., Gu, Q., Zhang, C., Bonifas, J. M., Lam, C. W., Hynes, M., Goddard, A., Rosenthal, A., Epstein, E. H., Jr. und de Sauvage, F. J. (1998) Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*, 391, 90-92.
- Yang, H. W., Kutok, J. L., Lee, N. H., Piao, H. Y., Fletcher, C. D., Kanki, J. P. und Look, A. T. (2004) Targeted expression of human MYCN selectively causes pancreatic neuroendocrine tumors in transgenic zebrafish. *Cancer research*, 64, 7256-7262.
- Yen, S. H. und Fields, K. L. (1981) Antibodies to neurofilament, glial filament, and fibroblast intermediate filament proteins bind to different cell types of the nervous system. *The Journal of cell biology*, 88, 115-126.
- Zeng, J., Ge, Z., Wang, L., Li, Q., Wang, N., Bjorkholm, M., Jia, J. und Xu, D. (2010) The histone demethylase RBP2 Is overexpressed in gastric cancer and its inhibition triggers senescence of cancer cells. *Gastroenterology*, 138, 981-992.

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

A

α	Anti
A	SI-Einheit Ampere
aCGH	<i>array-comparative genomic hybridization</i>
Ah	Adenohypophyse
ALK	Anaplastische Lymphomkinase
ARID	AT-reiche interaktive Domäne
AS	Astrozyte

B

BG	Bergman Glia
bHLH	<i>basic helix-loop-helix</i>
Bit	Benzisothiazolion
Brd4	<i>Bromodomain containing protein 4</i>
BrdU	Bromodesoxyuridin
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	Beziehungsweise

C

°C	Grad Celsius
ca.	<i>circa</i>
CaCl ₂	Kalziumchlorid
Cae	Caecum
CAG	Hühner Aktin Promotor
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cb	Cerebellum
Cre	<i>causes recombination</i>
Ct	<i>cycle threshold</i>
Cx	Cortex

D

D	Darm
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	Diaminidinphenylindol
DBH	Dopamin- β -Hydroxylase
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
do	<i>donkey</i>

E

E	Embryonaltag
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGL	externe granuläre Zellschicht
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
et al.	<i>Et alii</i>

F

FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fbxw7	<i>F-Box and WD repeat domain containing 7</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Fluc	Luciferase Gen

G

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
g	Gramm
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
	Saures Gliafaserprotein
GNP	Granulozytenvorläuferzelle

H

h	Stunde(n)
H2A	Histon 2A
H2B	Histon 2B
H3	Histon 3
H3K4	Histon 3 Lysin 4
H3K4me1	Histon 3 Lysin 4 Monomethyl
H3K4me2	Histon 3 Lysin 4 Dimethyl
H3K4me3	Histon 3 Lysin 4 Trimethyl
H3K9	Histon 3 Lysin 9
H4	Histon 4
HE	Hämatoxylin-Eosin
hGHpA	Polyadenyl-Stoppsequenz
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>

I

IC50	mittlere inhibitorische Konzentration
IHC	Immunhistochemie
IgG	Immunglobulin G
IGL	interne granuläre Zellschicht
IN	Interneuron
INSS	<i>International neuroblastoma staging system</i>
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle

J

JARID1C	JmjN, AT-reiche interactive Domäne
JmjC	Jumonji Domäne C
JMJD1A	<i>Jumonji domain-containing protein 1A</i>
JmjN	Jumonji Domäne N

K

0-Ktrl	Nullkontrolle
K20	Lysin 20
K27	Lysin 27
K36	Lysin 36
K4	Lysin 4
K79	Lysin 79
K9	Lysin 9
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
Ktrl.	Kontrolle

L

l	Liter
Le	Leber
lncRNA	<i>long non-coding RNA</i>
LoxP	<i>locus P of crossover P1</i>
LSD1	<i>Lysine specific demethylase 1</i>
Lsl	“lox-stop-lox” loxP flankierte Polyadenyl- Stoppsequenz
LV	Seitenventrikel

M

m	SI-Einheit Meter
M	Mol
MAD1	<i>Mitotic arrest deficient-like 1</i>
Malat1	<i>Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1</i>
Min	Minute(n)
Math-1	<i>mouse atonal homolog 1</i>
Mb	Medulloblastom
MEN1	Multiples endokrines Neoplasie Syndrom Typ 1
MES	Morpholinoethansulfon- säure
Met	Metastase
Mg	Magen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIBG	Metajodobenzylguaninidin
Mir-137	MicroRNA 137
ML	Molekularzellschicht
mo	<i>mouse</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>

MRT	Magnetresonanztomographie	R	
MTT	Dimethylthiazol-Diphenyltetrazoliumbromid	rb	<i>rabbit</i>
MYC	<i>Myelocytomatosis oncogene</i>	REST	<i>RE-1 silencing transcription factor</i>
N		RL	Rhombische Lippe
n	Anzahl der Experimente	RMCE	Rekombinase-vermittelte Kassettenaustauschstelle
n.t.	<i>non treated/</i> unbehandelt	RNA	Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid	RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay buffer</i>
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid	Rpm	<i>Round(s) per minute/</i> Umdrehungen
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat	RPMI	<i>Roswell Park memorial Institute</i>
NaN ₃	Natriumazid	S	
NCBI	<i>National Centre for Biotechnology Information</i>	s	SI-Einheit Sekunde(n)
Neat-1	<i>Nuclear Enriched Abundant Transcript 1</i>	scr RNA	<i>scrambled RNA</i>
Nh	Neurohypophyse	SDS	Sodiumdodecylsulfat
NP-40	tergitol NP-40	sh	<i>sheep</i>
O		Shh	<i>Sonic hedgehog</i>
OL	Oligodendrozyte	siRNA	<i>short interfering RNA</i>
Olig2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>	Smo	<i>Smoothened</i>
P		St	<i>Stella turcica</i>
P	postnataler Tag	T	
PAM	Prädiktionsanalyse von Mikroarrays	Tab.	Tabelle
Pbit	Phenylbenzisothiazolinon	TBS(T)	<i>Tris-buffered saline (+ Tween 20)</i>
PBS	<i>Phosphate buffered Saline</i>	Tg	transgen
Pc	<i>Plexus choroideus</i>	TH	Tyrosin Hydroxylase
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>	Tris	Tris(hydroxymethylaminomethan)
PFA	Paraformaldehyd	TrkA	Tyrosin Rezeptorkinase A
PHD	Pflanzenhomeotische Domäne	Trk B	Tyrosin rezeptorkinase B
Pi	<i>Pars intermediale</i>	U	
PL	Purkinjezellschicht	u.a.	unter anderem
PmsF	Phenylmethylsulfonylfluorid	UV	Ultraviolett
PN	Purkinjeneuron	V	
PNET	Primitiver neuroektodermaler Tumor	V	Volt
		V4	vierter Ventrikel
		Vergl.	Vergleiche
		VZ	Ventrikularzone

W

WB	Western Blot
Wnt	<i>Wingless Int-1</i>
Wt	wildtypisch

X

Xist	<i>X-inactive apecific transcript</i>
------	---------------------------------------

Z

z.B.	zum Beispiel
Zf	Zinkfinger Domäne
ZNS	zentrales Nervensystem

Länder wurden nach den internationalen Autokennzeichen abgekürzt. Es wurden die gängigen SI-Einheiten und SI-Präfixe verwendet.

9.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1	Präsentation des Neuroblastoms	3
Abbildung 1.2	Schematische Darstellung des Lsl-MYCN Konstrukts im ROSA 26 Lokus	9
Abbildung 1.3	Entwicklung des Cerebellums	10
Abbildung 1.4	In Math-1 <i>knock-out</i> Mäusen kommt es zu Abnormalitäten in der cerebellären Entwicklung	11
Abbildung 1.5	Medulloblastomentwicklung in der SmoM2;GFAP-Cre Maus	12
Abbildung 1.6	Nestin <i>knock-out</i> im Zebrafisch	13
Abbildung 1.7	Schematische Darstellung der humanen JARID Familie	15
Abbildung 1.8	Strukturformel von Pbit	15
Abbildung 4.1	JARID1C Expression im primären Neuroblastom	45
Abbildung 4.2	Expression von JARID1C in Neuroblastomzellen	45
Abbildung 4.3	Lokalisation von JARID1C in vier Neuroblastomzelllinien	46
Abbildung 4.4	Auswertung der mRNA- und Proteinlevel von JARID1C nach siRNA Transfektion	47
Abbildung 4.5	JARID1C siRNA vermittelter Anstieg von Apoptose in SHEP und IMR5 Zellen	48
Abbildung 4.6	Darstellung der Zellviabilität und Proliferation nach siRNA vermittelter JARID1C Runterregulation	49
Abbildung 4.7	Qualitative Auswertung der H3K4 Methylierung in SHEP und IMR5 Zellen nach siRNA vermittelter Reduktion von JARID1C	50
Abbildung 4.8	Darstellung der Malat1 Expression in Neuroblastomzelllinien	51
Abbildung 4.9	Phänotyp und Anteil apoptotischer SHEP und IMR5 Zellen nach JARID1C Inhibition durch Pbit	52
Abbildung 4.10	Western Blot Analyse zum Methylierungsstatus in SHEP und IMR5 Zellen nach Pbit Behandlung	53
Abbildung 4.11	Verteilung der Genotypen der Nachkommen der SmoM2;GFAP-Cre Linie	54
Abbildung 4.12	Kaplan-Meier Analyse von SmoM2;GFAP-Cre transgenen Tieren	55
Abbildung 4.13	Histologische Untersuchung der SmoM2;GFAP-Cre Mäuse	55

Abbildung 4.14	Verteilung der Genotypen der Nachkommen der Lsl-MYCN;Nestin-Cre Verpaarung	56
Abbildung 4.15	PCR Analyse von organen der Lsl-MYCN;Nestin-Cre Maus	57
Abbildung 4.16	Luciferase <i>Imaging</i> von Lsl-MYCN;Nestin-Cre Mäusen	57
Abbildung 4.17	Verteilung der Genotypen der Nachkommen der Lsl-MYCN;Math1-Cre Verpaarung	58
Abbildung 4.18	Verteilung der Genotypen der Nachkommen der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Verpaarung	59
Abbildung 4.19	PCR Analyse von Organen einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre doppelt-transgenen Maus	60
Abbildung 4.20	Kaplan-Meier Analyse der Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäuse	61
Abbildung 4.21	Lokalisation und Anatomie der Tumore ind Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäusen	62
Abbildung 4.22	Luciferase Imaging von Lsl-MYCN;GFAP-Cre Mäusen	62
Abbildung 4.23	Luciferase Imaging von Pankreasgewebe einer doppelt-transgenen Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus	63
Abbildung 4.24	Histologie des Pankreastumors einer Lsl-NMY;GFAP-Cre Maus	64
Abbildung 4.25	Histologie der Langerhans'schen Inseln im Pankreasgewebe einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre doppelt-transgenen Maus	65
Abbildung 4.26	Histologie des Hirntumors einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus	66
Abbildung 4.27	Glukagon- und Insulingehalt in Tumor und Blut einer Lsl-MYCN;GFAP-Cre Maus	67
Abbildung 4.28	Darstellung der aCGH Analyse eines Lsl-MYCN;GFAP-Cre Tumors	68
Abbildung 4.29	In vivo Imaging von IID2 Xenografts	69
Abbildung 4.30	Vergleich der Pankreaskarzinomzelllinien Pank4, IC11, IC11 Xeno, IID2 und IID2 Xeno	70
Abbildung 4.31	Darstellung der Tumorentwicklung von Pak 4 Xenografts unter DMSO, JQ1 und MLN 8237 Behandlung	71
Abbildung 4.32	Histologische Untersuchung von Pank 4 Xenograft Tumoren nach Behandlung mit DMSO, JQ1 oder MLN 8237	71
Abbildung 4.33	IC50 Werte der gewonnenen Pankreaszelllinien unter JQ1 bzw. MLN 8237 Behandlung	72

9.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1.1	Verwendete Antikörper, siRNA, Inhibitoren	17
Tabelle 3.1.2	Verwendete Primer und PCR-Bedingungen	18
Tabelle 3.1.3	Verwendete Mauslinien	19
Tabelle 3.1.4	Lösungen und Puffer	19
Tabelle 3.1.5	Geräte und Gebrauchsmaterialien	23
Tabelle 3.1.6	Kommerzielle Anwendungen, Isolierungs- und Aufreinigungssysteme	26
Tabelle 3.1.7	Kommerzielle Lösungen, Substanzen, Chemikalien	26
Tabelle 3.1.8	EDV	28
Tabelle 3.2.1	Pipettierschema der siRNA Transfektion	30

9.4 Publikationen und Kongressbeiträge

9.4.1 Publikationen

Schramm, A.; Schowe, B.; **Fielitz, K.**; Heilmann, M.; Martin, M.; Marschall, T.; Köster, J.; Vandesompele, J.; Vermeulen, J.; de Preter, K.; Koster, J.; Versteeg, R.; Noguera, R.; Speleman, F.; Rahmann, S.; Eggert, A.; Morik, K.; Schulte, J.H.:

Exon-level expression analyses identify MYCN and NTRK1 as major determinants of alternative exon usage and robustly predict primary neuroblastoma outcome.

Br J Cancer. 2012, Oct 9;107(8):1409-17. doi: 10.1038/bjc.2012.391.

Schramm, A.; Köster, J.; Marschall, T.; Martin, M.; Schwermer, M.; **Fielitz, K.**; Büchel, G.; Barann, M.; Esser, D.; Rosenstiel, P.; Rahmann, S.; Eggert, A.; Schulte, J.H.:

Next-generation RNA sequencing reveals differential expression of MYCN target genes and suggests the mTOR pathway as a promising therapy target in MYCN-amplified neuroblastoma.

Int J Cancer. 2013 Feb 1;132(3):E106-15. doi: 10.1002/ijc.27787. Epub 2012 Sep 26.

Lee, S.; Rahnenführer, J.; Lang, M.; De Preter, K.; Mestdagh, P.; Koster, J.; Versteeg, R.; Stallings, R.L.; Varesio, L.; Asgharzadeh, S.; Schulte, J. H.; **Fielitz, K.**; Schwermer, M.; Morik, K.; Schramm, A.:

Robust selection of cancer survival signatures from high-throughput genomic data using two-fold subsampling.

PLoS One. 2014 Oct 8;9(10):e108818. doi: 10.1371/journal.pone.0108818. eCollection 2014.

9.4.2 Kongressbeiträge

9.4.2.1 Vorträge

Fielitz, K.; Schowe, B.; Schulte, J.H.; Vandesompele, J.H.; Mestdag, P.; Eggert, A.; Morik, K.; Schramm, A.- *The JARID1C histone demethylase is upregulated in aggressive neuroblastomas independent of MYCN amplification.* Klin Padiatr 2012; 224 - A27 DOI: 10.1055/s-0032-1310494

25. Jahrestagung der Kind Philipp Tagung 06.06 – 09.06.2012; Wilsede, Deutschland

9.4.2.2 Posterpräsentationen

Kathrin Fielitz, Benjamin Schowe, Johannes H. Schulte, Jo Vandesompele, Pieter Mestdag, Angelika Eggert, Katharina Morik, Alexander Schramm - *The JARID1C histone demethylase is upregulated in aggressive neuroblastoma independent of MYCN amplification.*

Advanced Neuroblastom Research Conference, 08.-21. Juni 2012, Toronto, Kanada

Kathrin Fielitz, Sangkyun Lee, Johannes H. Schulte, Jo Vandesompele, Pieter Mestdag, Angelika Eggert, Katharina Morik, Alexander Schramm - *The JARID1C histone demethylase is upregulated in aggressive neuroblastomas independent of MYCN amplification*

Pediatric Cancer Research at the INTERFACE, 06.-08. Juni 2013, Wien, Österreich

Kathrin Fielitz, Sangkyun Lee, Pieter Mestdag, Jo Vandesompele, Angelika Eggert, Katharina Morik, Johannes H. Schulte*, Alexander Schramm - High expression of the histone demethylase JARID1C correlates with aggressive tumor stages independently of MYCN and controls proliferation and apoptosis in preclinical NB models

Advanced Neuroblastom Research Conference, 13.-16. Mai 2012, Köln, Deutschland

9.5 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

9.6 Erklärungen

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung der Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „*Modellierung der MYCN-getriebenen Tumorgenese in vitro und in transgenen Mausmodellen*“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Kathrin Fielitz befürworte.

Essen, den 13.02.2015 _____

PD Dr. rer. nat. Alexander Schramm

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, c und e der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe und alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen als solche gekennzeichnet habe.

Essen, den 13.02.2015 _____

Kathrin Fielitz

Erklärung

Hiermit erkläre ich, gem. § 7 Abs. 2, d und f der Promotionsordnung der Math.-Nat. Fakultäten zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe, dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist, und dass ich die Dissertation nur in diesem Verfahren einreiche.

Essen, den 13.02.2015 _____

Kathrin Fielitz